



Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Avaliação do processo de imunização de murganhos vacinados
com *virus-like particles* (VLPs) contendo candidatos antigénicos
de *Trypanosoma cruzi*

Yulia Aleksandrovna Yanshina

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

JANEIRO, 2017



Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Avaliação do processo de imunização de murganhos vacinados
com *virus-like particles* (VLPs) contendo candidatos antigénicos
de *Trypanosoma cruzi*

Autor: Yulia Aleksandrovna Yanshina

Orientador: Professor Doutor Marcelo Sousa Silva

Coorientador: Professor Doutor Diego Guérin

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de mestre em Ciências Biomédicas, especialidade de Biologia Molecular em Medicina Tropical e Internacional

JANEIRO, 2017

“Sábio é aquele que conhece os limites da própria ignorância”
Sócrates

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à minha mãe Rasilya Yanshina, pela força e coragem que me proporcionou durante esta etapa. Благодарю маму Расию Яньшину за поддержку в течении всех этих лет.

Um especial obrigado ao meu namorado Ricardo Almeida e à sua família, que me apoiaram em todas as decisões e me ajudaram a encontrar sempre o caminho mais correto.

Gostaria de agradecer à minha colega Joana Monteiro pela pessoa que é, pela sua vontade de ajudar e disponibilidade durante os primeiros passos da investigação.

Aos meus professores, orientador Dr. Marcelo Silva e coorientador Dr. Diego Guérin, apesar da distância estiveram sempre presentes nas alturas certas.

De mencionar também os meus professores do IHMT, que ao longo destes anos de mestrado me ajudaram neste percurso académico.

Um especial agradecimento ao coordenador do Mestrado de Ciências Biomédicas Celso Cunha.

Um enorme obrigado à Dra. Aline Ribeiro e Jailson Querido, apesar de não ter o privilégio de trabalharmos juntos, estão sempre prontos para ajudar.

Agradeço à Dra. Diana Machado do departamento de Microbiologia Médica do IHMT, por me compreender e receber no momento mais enredado de sempre.

À Dra. Dinora pelo seu profissionalismo, compreensão e contribuição durante a experiência e disponibilidade em todos os momentos.

Agradeço, igualmente, aos meus colegas de trabalho dentro do Instituto de Higiene e Medicina Tropical pela amizade e risadas que houve nos intervalos de trabalho.

O meu sincero Obrigada!

Índice

Índice de figuras	v
Índice de tabelas	vii
Lista de abreviaturas	viii
Resumo	ix
Abstract	x
1. Introdução	1
1.1 Doenças Tropicais Negligenciadas	1
1.2 O parasita	2
1.2.1 <i>Trypanosoma cruzi</i>	2
1.2.2 O ciclo de vida.....	5
1.2.3 Transmissão de <i>Trypanosoma cruzi</i>	7
1.2.4 Vetores de <i>Trypanosoma cruzi</i>	7
1.3 Doença de Chagas	9
1.3.1 Epidemiologia.....	9
1.3.2 Apresentação clínica da doença de Chagas	10
1.3.3 Aspectos imunológicos da doença de Chagas	11
1.3.4 Diagnóstico laboratorial da doença de Chagas.....	16
1.3.5 Opções terapêuticas para o tratamento da doença de Chagas	17
1.3.6 Medidas de controlo e prevenção da doença de Chagas	19
1.4 História do desenvolvimento de vacinas contra <i>Trypanosoma cruzi</i>	20
1.4.1 <i>Heat-shock Protein 70</i> (HSP70) como candidato antigénico para vacina contra <i>T. cruzi</i>	23
1.5 <i>Virus-like particles</i> (VLPs)	24
1.6 <i>Triatoma virus</i> e a produção de <i>virus-like particles</i>	29
2. Objetivos	33
3. Materiais e métodos	35

3.1 Animais	35
3.2. Amostras de soros humanos de pacientes com doença de Chagas	35
3.3. Estirpes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	35
3.4 Isolamento e purificação de <i>Triatoma virus</i>	36
3.4 Produção do peptídeo HSP70.....	36
3.5 Conjugação dos peptídeos de <i>Trypanosoma cruzi</i> às partículas de <i>Triatoma vírus</i>	37
3.6 Produção de soro policlonal anti-TrV-VLPs e anti-peptídeos	38
3.7 Ensaio imunoenzimático (ELISA) para a pesquisa de anticorpos anti-TrV-VLPs e anti-peptídeos	40
4. Resultados e discussão	43
4.1 Caracterização da propriedade imunoestimulatória de TrV-VLPs em modelo murino	44
4.2 Caracterização da resposta imune humoral nos murganhos imunizados com SATA-TLQPVERVL isolado	46
4.3 Otimização do processo de imunização de murganhos vacinados com TrV-VLPs contendo sequência antigénica de <i>T. cruzi</i>	50
4.4 Caracterização da resposta imune humoral em soros humanos frente ao peptídeo SATA-TLQPVERVL	51
4.5 Caracterização da resposta imune humoral nos murganhos imunizados com TrV- VLP-SATA-TLQPVERVL- <i>D-ala</i>	52
4.6 Caracterização da resposta imune humoral em soros humanos frente ao peptídeo SATA-TLQPVERVL- <i>D-ala</i>	56
5. Conclusão.....	59
6. Referências	62

Índice de figuras¹

Figura 1. Representação esquemática dos organelos de <i>T. cruzi</i>	2
Figura 2. Classificação das subdivisões de <i>T. cruzi</i>	3
Figura 3. Distribuição geográfica de diferentes DTUs de <i>T. cruzi</i> na América do Norte, Centro e Sul com as respectivas formas clínicas e hospedeiros..	4
Figura 4. Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i>	5
Figura 5. Representação esquemática da constituição celular das diferentes formas de <i>T. cruzi</i> : amastigota (A), epimastigota (B) e tripomastigota (C)..	6
Figura 6. Distribuição das espécies de triatomíneos na América Central e na América do Sul.	8
Figura 7. Distribuição da doença de Chagas reportada pela OMS..	9
Figura 8. A figura A representa a evolução aguda (sinal de Romana). A figura B representa a evolução crónica (distúrbio cardíaco).....	11
Figura 9. Moléculas envolvidas no processo de adesão e invasão celular de <i>T. cruzi</i> . .	12
Figura 10. Diferentes mecanismos envolvidos na internalização de <i>T. cruzi</i> nas células do hospedeiro.....	13
Figura 11. Mecanismos de resposta da imunidade inata e adquirida durante a infeção por <i>T. cruzi</i>	14
Figura 12. Representação esquemática da aplicação da terapêutica de <i>T. cruzi</i> com utilização das partículas nanotransportadoras nas diferentes fases de infeção.....	19
Figura 13. Representação do reconhecimento das VLPs pelas células do sistema imune..	25
Figura 14. Características imunogénicas da VLP apresentadora de antígenos..	25
Figura 15. Classificação de diferentes tipos de VLPs baseada no número de proteínas de superfície e existência de envelope.....	26
Figura 16. Cronologia dos acontecimentos da história das vacinas baseadas em VLPs..	27
Figura 17. Árvore filogenética de <i>Dicistroviridae</i> ..	29

¹Todas as figuras presentes neste trabalho que foram extraídas dos respetivos artigos não foram traduzidas

Figura 18. Organização do genoma de <i>Picornaviridae</i> e <i>Dicistroviridae</i>	30
Figura 19. Estrutura do virião de Triatoma vírus... ..	31
Figura 20. Estrutura química do ligante heterobifuncional de Sulfo-SMCC.	37
Figura 21. Síntese de conjugação do peptídeo com TrV-VLPs via NH ₂ -SH.	38
Figura 22. Determinação de anticorpos IgG Total anti-TrV-VLPs pelo método de ELISA indireto em soros de <i>Mus musculus</i> (CD1) de 3 grupos.....	45
Figura 23. Determinação de anticorpos IgG Total anti-SATA-TLQPVERVL pelo método de ELISA indireto em soros de <i>Mus musculus</i> (CD1) machos de 3 grupos.	47
Figura 24. Determinação de anticorpos IgG Total anti-VLP-SATA-TLQPVERVL pelo método de ELISA indireto em soros de <i>Mus musculus</i> (CD1) de 3 grupos.	49
Figura 25. Determinação de anticorpos IgG Total anti-SATA-TLQPVERVL pelo método de ELISA indireto em soros de murganhos infectados com <i>T. cruzi</i>	51
Figura 26. Determinação de anticorpos IgG Total anti-SATA-TLQPVERVL pelo método de ELISA indireto em soros humanos com <i>T. cruzi</i>	52
Figura 27. Determinação de anticorpos IgG Total anti-TrV-VLP-SATA-TLQPERVL-D-ala pelo método de ELISA indireto em soros de <i>Mus musculus</i> (CD1) de 4 grupos.	53
Figura 28. Análise comparativa entre a resposta (A) Th1 e (B) Th2. Determinação de anticorpos IgG2a e IgG1 anti-TrV-VLP pelo método de ELISA indireto em soros de <i>Mus musculus</i> (CD1) de 4 grupos.....	54
Figura 29. Análise comparativa entre a resposta (A) Th1 e (B) Th2. Determinação de anticorpos IgG2a e IgG1 anti-TrV-VLP-SATA-TLQPVERVL-D-ala pelo método de ELISA indireto em soros de <i>Mus musculus</i> (CD1) de 4 grupos.....	55
Figura 30. Determinação de anticorpos IgG Total anti- <i>T. cruzi</i> pelo método de ELISA indireto em soros de <i>Mus musculus</i> (CD1) de 4 grupos.	56
Figura 31. Determinação de anticorpos IgG Total anti-SATA-TLQPVERVL-D-ala pelo método de ELISA indireto em soros humanos com <i>T. cruzi</i>	57

Índice de tabelas

Tabela 1. Diferentes tipos de vacinas testadas contra <i>T. cruzi</i>	22
Tabela 2. Comparação de diferentes sistemas onde são produzidas VLPs.....	28
Tabela 3. Protocolo de imunização dos murganhos com TrV-VLPs, TrV-VLPs-SATA-TLQPVERVL conjugado e SATA-TLQPVERVL isolado	39
Tabela 4. Protocolo de imunização dos murganhos com novo peptídeo contendo terminal <i>D-ala</i> . Animais imunizados com TrV-VLPs, TrV-VLP-SATA-TLQPVERVL- <i>D-ala</i> (peptídeo conjugado), SATA-TLQPVERVL- <i>D-ala</i> (peptídeo isolado), e TrV-VLP com peptídeo SATA-TLQPVERVL- <i>D-ala</i> (não conjugado)	40

Lista de abreviaturas

CD - *Cluster of differentiation*

D-ala – D-Alanina, estereoisomero de L-Alanina

DTU – *Discrete Typing Units*

DMSO – *Dimethyl Sulfoxide*

DTN - Doenças Tropicais Negligenciadas

ELISA – *Enzyme linked Immunosorbent Assay*

gp - Glicoproteínas de superfície

HLA - *Human leukocyte antigen*

HSP - Proteína de choque

IFN- γ – Interferão gama

Ig – Imunoglobulina

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

IL – Interleucina

kDNA - DNA do cinetoplasto

KAP - *Kinetoplast associated protein*

MHC - Complexo de histocompatibilidade major

OMS – Organização Mundial da Saúde

PBS – *Phosphate Buffered Saline*

PAHO - Organização Panamericana de Saúde

PCR - *Polymerase chain reaction*

NK – *Natural killer*

NO – Óxido nítrico

ROS – *Reactive Oxygen Species*

SATA – *N-succinimidyl S-acetylthioacetate*

Tc – *Trypanosoma cruzi*

T. cruzi - *Trypanosoma cruzi*

TrV - Triatoma vírus

TrV-VLPs - VLPs do vírus TrV

Th - Linfócitos T helper

VP - proteínas do vírus

VLPs- *Virus-like particles*

Resumo

A doença de Chagas, também denominada de Tripanossomíase Americana, é uma infecção causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*. Foi estimado que 7 milhões de pessoas do mundo estão infetadas com *T. cruzi* e mais de 25 milhões estão em risco de infecção. Ao longo dos anos têm sido testados vários antígenos com o intuito de produzir vacinas contra a doença de Chagas e até o presente nenhuma destas conseguiu chegar a ensaios clínicos em humanos, embora tenham sido aplicadas várias estratégias imunoterapêuticas para combater a infecção, tais como vacinas de DNA e antígenos recombinantes. A produção de vacinas baseadas nas *Virus-like Particles* (VLPs) ainda não foi completamente explorada no contexto da doença de Chagas. Neste trabalho pretendeu-se avaliar a resposta imune humoral em murgos imunizados com VLPs de *Triatoma virus* (TrV-VLPs) que contêm peptídeos com sequências antigénicas de *T. cruzi*. Começou-se por caracterizar as propriedades imunoestimuladoras de TrV-VLPs através da otimização do processo de imunização. Por fim, definiu-se a resposta humoral nos murgos avaliando a produção dos anticorpos anti-TrV-VLPs e anticorpos anti-*T. cruzi*. Foi selecionado o peptídeo sintético SATA-TLQPVERVL baseado no trabalho realizado por outros investigadores. Neste estudo, o peptídeo foi quimicamente conjugado à superfície das TrV-VLPs por meio dos ligantes com grupos específicos, posteriormente, foi submetido a ensaios de imunização em murgos. Inicialmente, não foi possível verificar a indução de anticorpos IgG totais anti-peptídeo nos animais imunizados com TrV-VLP conjugado com peptídeo. Posteriormente, alterou-se a estratégia de produção do peptídeo, onde se adicionou uma *D-ala* para melhorar a sua biodisponibilidade. Com esta nova estratégia foi possível determinar a presença de anticorpos IgG totais anti-SATA-TLQPVERVL-*D-ala*, bem como as subclasses, IgG1 e IgG2a, nos murgos imunizados. Em conclusão, os resultados finais sugerem que o peptídeo SATA-TLQPVERVL-*D-ala* conjugado à superfície da TrV-VLPs poderá ser um importante candidato para o desenvolvimento de potenciais vacinas para a doença de Chagas.

Palavras-chaves: Doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, Vacinas, Virus-like particles (VLPs), *Triatoma virus*.

Abstract

Chagas disease, also known as American trypanosomiasis, is a tropical parasitic disease caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*. It was estimated that 7 million people are infected with *T. cruzi* and over 25 million are at risk of infection. Over the years, several antigens have been tested with the goal of vaccine production against Chagas disease, but neither was able to reach human clinical trials. In an effort to revert this situation, various immunotherapeutic strategies were applied to try and oppose the spreading of the infection, namely the DNA vaccines, and recombinant antigens. Production of vaccines based on *Virus-like Particles* (VLPs) has not yet been explored on the context of Chagas disease. This work proposes to evaluate the humoral immunity on house mice (*Mus musculus*) immunized with VLPs of *Triatoma virus* (TrV-VLPs) that contain peptides with antigenic sequences of *T. cruzi*. The first step was to characterize the immunostimulant properties of TrV-VLPs by optimizing the immunization process. Then, humoral response on house mice was defined evaluating the production of antibodies anti-VLPs and antibodies anti-*T. cruzi*. The synthetic peptide (SATA-TLQPVERVL), based on work done by others, was selected. In this study, the peptide was chemically conjugated on the surface of TrV's VLP via ligands with specific groups and posteriorly submitted to trials of immunization in house mice. Initially, it wasn't possible to verify the production of total IgG antibodies anti-peptide on the animals immunized with TrV's VLP conjugated with the peptide. Posteriorly, by changing the strategy of peptide production, where *D-ala* was added to improve its bioavailability. Following this new strategy, it was possible to detect the presence of total IgG antibodies anti-SATA-TLQPVERVL-*D-ala* with the associated subclasses, IgG1 and IgG2a. In conclusion, final results suggest that this peptide, SATA-TLQPVERVL-*D-ala* conjugated on the surface of TrV's VLP might well be is an important candidate to the development of potential vaccines for Chagas disease.

Keywords: Chagas disease, *Trypanosoma cruzi*, Vaccines, Virus-like particles (VLPs), *Triatoma virus*.

1. Introdução

1. Introdução

1.1 Doenças Tropicais Negligenciadas

As doenças tropicais negligenciadas (DTNs) têm sido, desde há muito tempo, um grande problema nas populações pobres de África, Ásia e América Latina. A designação surge devido à localização dentro das populações referidas, que habitam em áreas rurais remotas ou zonas de conflito nos países em desenvolvimento. São na sua maioria provocadas por vermes, protozoários, bactérias e vírus. Estima-se que em 149 países cerca de um mil milhões de pessoas estejam afetadas (WHO, 2015).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), existem 17 doenças tropicais negligenciadas que estão na lista para eliminação até 2020, as quais são: Raiva (doença causada por vírus do género *Lyssavirus*); Dengue (causada por vírus dengue do género *Flavivirus*); Tracoma (causada pela *Chlamydia trachomatis*); Úlcera de Buruli (infecção por *Mycobacterium ulcerans*); Treponematoses endémicas (causada por bactérias do género *Treponema*); Lepra (hanseníse - doença de Hansen, causada pela *Mycobacterium leprae*); Doença de Chagas (tripanossomíase americanam, infeção causada por *Trypanosoma cruzi*); Doença de Sono (tripanossomíase africana, infeção causada por *Trypanosoma brucei*); Leishmaniose (causada por protozoários da família *Tripanosomatidae*, género *Leishmania*); Cisticercose (desenvolvida por *Taenia solium* *cysticerci*); Dracunculíase (infeção pelo verme da guiné); Equinococose (causada por *Echinococcus granulosus* ou *E. multiloculares*); Infeções por trematódes causadas por alimentos, Filariose linfática (causada pela *Wuchereria bancrofti*); Oncocercose (cegueira dos rios, causada por *Onchocerca volvulus*), Esquistossomose e Helminthíases transmitidas pelo solo (WHO, 2015).

Um dos principais objetivos do departamento de controlo das doenças tropicais negligenciadas é coordenar e apoiar as políticas e estratégias para prevenir, controlar, eliminar e erradicar as doenças (WHO, 2015).

A OMS propõe várias estratégias de saúde pública para a prevenção e o controlo das DTNs: medicação preventiva; desenvolvimento de vacinas intensificação da gestão de casos; controle de vetores; provimento de água limpa, saneamento e higiene; e saúde pública animal (WHO, 2013; WHO, 2015).

1.2 O parasita

1.2.1 *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi é o agente etiológico da doença de Chagas que afeta milhões de pessoas em todo o mundo, mais propriamente na América Latina. A primeira abordagem do parasita foi feita em 1909 por Carlos Chagas. É um protozoário flagelado da família Trypanosomatidae ordem Kinetoplastida (Lima *et al.*, 2014; WHO, 2012).

Pertencendo à ordem Kinetoplastida, o parasita apresenta na sua estrutura cinetoplasto que é constituída por uma rede de moléculas de DNA mitocondrial (kDNA), localizada na mitocôndria única do protozoário (Figura 1). O kDNA corresponde a 20-25% do DNA do organismo (Vargas-Parada, 2010).

O kDNA tem forma de disco e está conectado ao corpo basal. A partir deste corpo nasce o flagelo, por meio de filamentos que atravessam a membrana mitocondrial. O kDNA é composto por dezenas de maxicírculos e milhares de minicírculos que estão concatenados formando uma rede que é estabilizada pelo menos por quatro tipos de proteínas semelhantes às histonas, denominadas de KAP (*kinetoplast associated protein*) (Tyler & Engman, 2001)

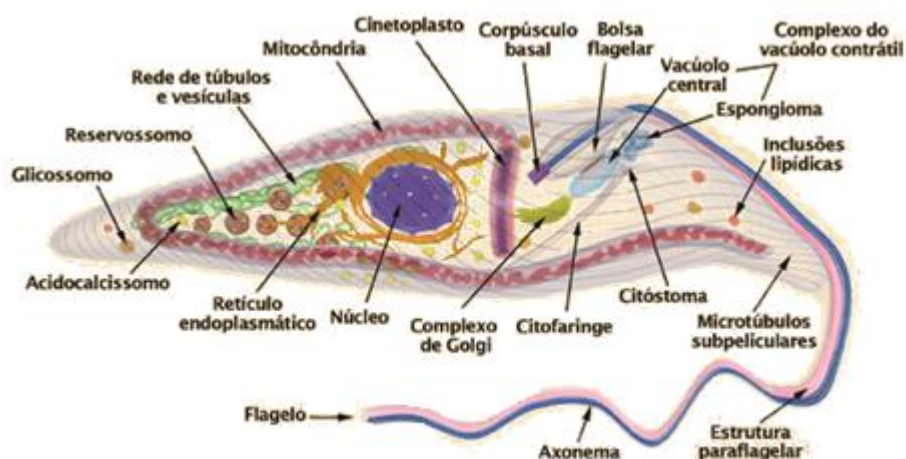


Figura 1. Representação esquemática dos organelos de *T. cruzi*. Extraído de <http://www.open.edu/openlearnworks/mod/page/view.php?id=40791>

Estas proteínas compactam os mini e maxicírculos dando forma de disco ao cinetoplasto (Tyler & Engman, 2001). Para além do kDNA a sua célula eucariótica é constituída pelo núcleo, membrana plasmática, aparelho de golgi e retículo endoplasmático. O citoesqueleto da célula é formado por microtúbulos, sem a presença de centríolos (Teixeira *et al.*, 2011).

Graças ao desenvolvimento tecnológico, nomeadamente das técnicas moleculares baseadas em marcadores genéticos, foi possível classificar *T. cruzi* em seis grupos independentes, também denominadas de DTUs (do inglês *Discrete Typing Units*, Unidades Discretas de Tipagem) TcI – TcVI (Figura 2) (Zingales *et al.*, 2009; Lewis *et al.*, 2009). Contudo, ainda existe muita divergência em relação às subdivisões das origens evolutivas de TcIII, TcIV, TcV e TcVI. No entanto, TcI e TcII são reconhecidas por serem os primeiros grupos ancestrais. Recentemente descobriu-se mais um genótipo de *T. cruzi* que prevalece no grupo dos morcegos denominado por TcBat (Lima *et al.*, 2014; Lima *et al.*, 2015; Manoel-Caetano & Elizabete, 2007; Tomasini & Diosque, 2015; Cominetti *et al.*, 2014; Shender *et al.*, 2016).

Gene Target (primers)	Expected PCR amplicon size or expected number of bands following restriction fragment length polymorphism (RFLP)					
LSU rDNA ² PCR Product (D71/D72)	110	125	110	117/120/125/130	110 ³	125
HSP60 ⁴ PCR-RFLP	1	1	2	1	3	3
Mini-exon ⁵ PCR Product (TC/TC1/TC2)	350	300	none/250/ faint 350	none/400	300	300
GPI ⁶ PCR-RFLP	2	3	2	2 or 3	4	4
<i>T. cruzi</i> DTU	TcI	TcII	TcIII	TcIV	TcV	TcVI

Figura 2. Classificação das subdivisões de *T. cruzi*. Extraído de Shender *et al.*, 2016, inicialmente adaptado de Lewis *et al.*, 2009.

O parasita *T. cruzi* é diploide e geneticamente polimórfico. Os eventos de hibridização são muito importantes dando origem à vasta heterogenicidade taxonômica (taxon) do parasita (Lima *et al.*, 2014).

Vários estudos indicam que os grupos TcI e TcII são mais divergentes ao nível molecular do que se pensava (Zingales *et al.*, 2012). Nomeadamente aos grupos TcIII e TcIV sugere-se que estes podiam ter resultado do evento de hibridização dos grupos TcI e TcII. Para além disso, os grupos TcIII e TcIV resultam de um único grupo ancestral. No entanto, os outros grupos, TcV e TcVI são vistos como híbridos de TcII e TcIII (Higuera *et al.*, 2013).

Geograficamente, os genótipos TcII, TcV e TcVI prevalecem no sul do continente latino e são a principal causa da doença de Chagas. TcII tem maior impacto no centro e leste do Brasil, TcV na Argentina, Bolívia e Paraguai, finalmente o TcVI no Grande Chaco (vasta planície de floresta e selva) (Figura 3) (Cosentino & Agüero, 2012).

A distribuição das DTUs depende de diferentes parâmetros, tais como a ecologia, vetores, hospedeiros, área geográfica e associação com a doença. Como também, os ensaios “*in vitro*” e “*in vivo*” revelam variação fenotípica entre as estirpes de *T. cruzi* ao nível fisiológico e bioquímico, existindo a correlação entre a genética dos grupos e o seu potencial de infeção. (Cosentino & Agüero, 2012).

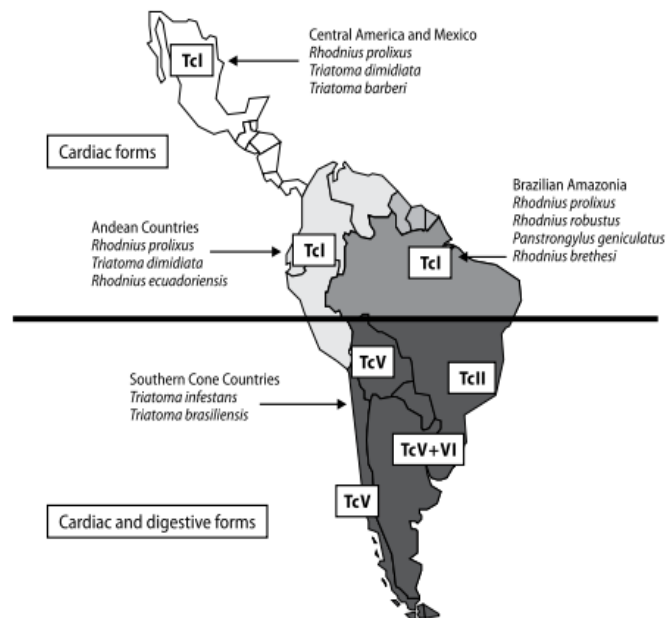


Figura 3. Distribuição geográfica de diferentes DTUs de *T. cruzi* na América do Norte, Centro e Sul com as respetivas formas clínicas e hospedeiros. Extraído de WHO, 2012.

1.2.2 O ciclo de vida

O protozoário *T. cruzi* é um parasita intracelular obrigatório que afeta diversas células do corpo humano, desde cardíacas até intestinais, dando origem ao seu desenvolvimento. O parasita possui um ciclo evolutivo heteroxénico passando por dois hospedeiros, em que a passagem no hospedeiro humano (vertebrado) é crucial para completar o ciclo biológico. A figura 4 mostra o processo de evolução de diferentes formas parasitárias. Dentro do hospedeiro invertebrado são encontradas as formas epimastogotas e tripomastigotas metacíclicas, no hospedeiro vertebrado são encontradas as formas amastigotas (intracelulares) (Neves, 2004; Blim *et al.*, 2008).

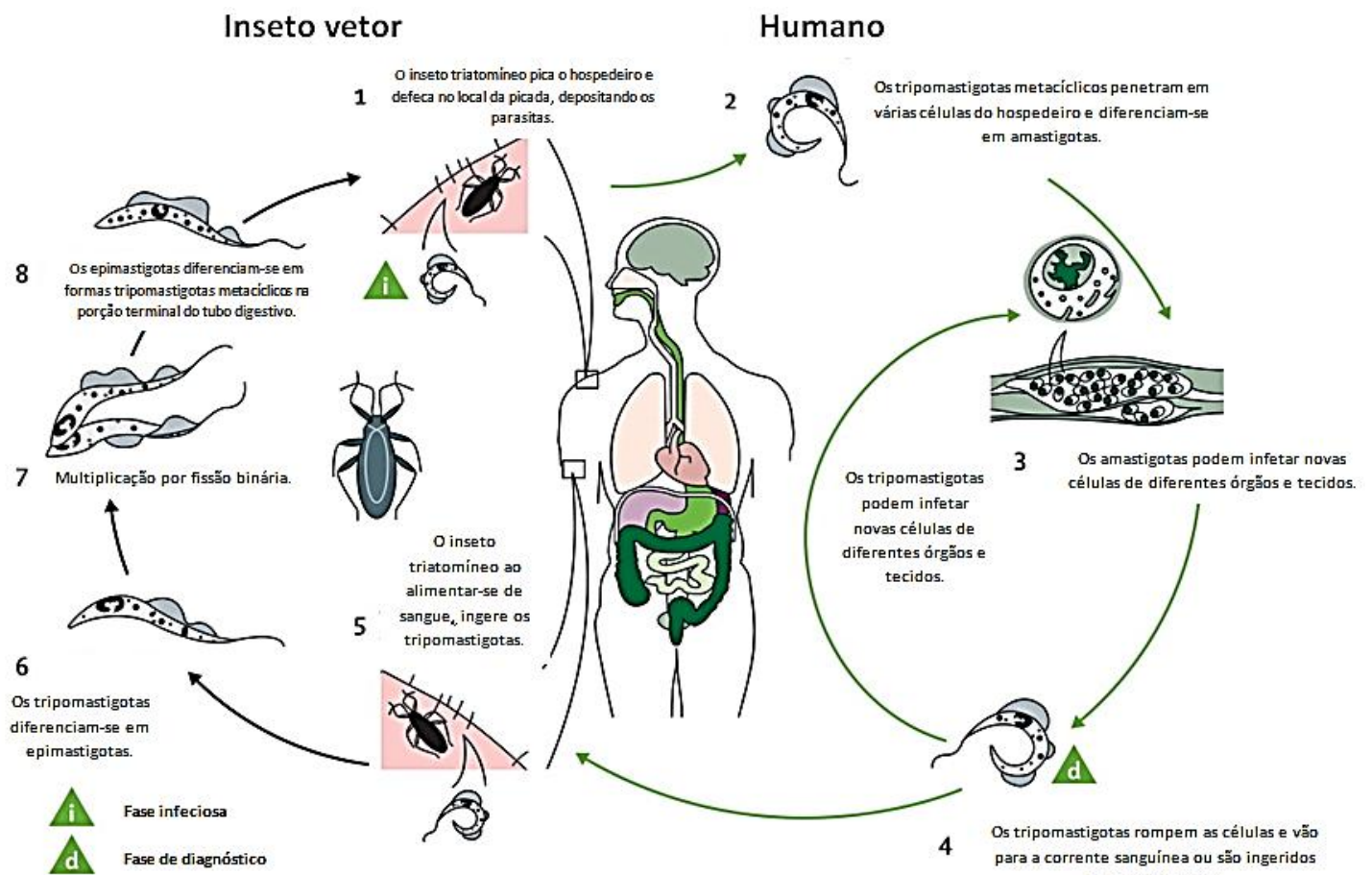


Figura 4. Ciclo de vida de *T. cruzi*. Extraído e adaptado de Blum *et al.*, 2008.

O ciclo de vida consiste em três principais formas de desenvolvimento, como representado esquematicamente na figura 5 (Teixeira *et al.*, 2012). As formas epimastigotas são extracelulares e não infecciosas para o hospedeiro invertebrado. São encontradas no intestino médio do inseto onde se multiplicam por divisão binária. Posteriormente, estes movem-se ao longo do intestino onde se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos que têm capacidade de infectar as células do mamífero, penetrando através das fissuras na pele e membranas mucosas, transformando-se na terceira forma evolutiva, denominada de amastigotas. Estas formas multiplicam-se dentro das células hospedeiras até passarem para a corrente sanguínea, por ruptura celular, em forma tripomastigotas. Os tripomastigotas são ingeridos pelo inseto durante o raspo sanguíneo. Após a refeição, o triatomíneo defeca e a contaminação acontece através de uma solução de continuidade por fezes do parasita. Deste modo inicia-se mais um ciclo de vida de *T. cruzi* (Teixeira *et al.*, 2012).

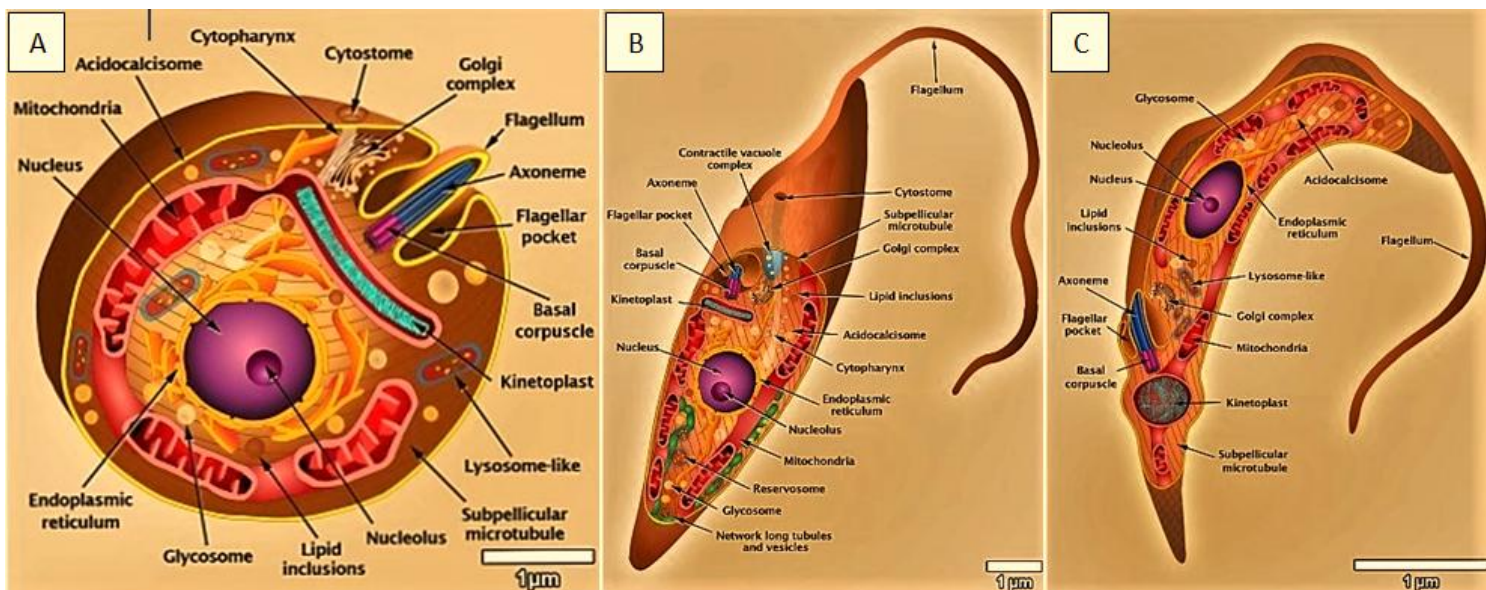


Figura 5. Representação esquemática da constituição celular das diferentes formas de *T. cruzi*: amastigota (A), epimastigota (B) e tripomastigota (C). Extraído de Teixeira et al., 2012.

1.2.3 Transmissão de *Trypanosoma cruzi*

O parasita pode ser transmitido por diferentes mecanismos, tais como o transplante de órgãos e transfusão sanguínea; via congênita (vertical) quando mulheres grávidas portadoras de *T. cruzi* infetam os bebês através da placenta; via oral através da ingestão de alimentos contaminados com parasitas provenientes de triatomíneos infetados; por acidentes de trabalho, ocorrendo pelo contato da pele lesada ou de mucosas com sangue contaminado, fezes de triatomíneos ou animais contaminados (Neves, 2004; CDC, 2013).

No entanto, a principal via de transmissão é através do vetor triatomíneo. Esta ocorre quando o parasita pica o seu hospedeiro para se alimentar e enquanto faz a sua refeição, tende a defecar sobre a superfície. As fezes contêm as formas infetantes do parasita que penetram pelo orifício da picada durante a solução de continuidade (CDC, 2013).

1.2.4 Vetores de *Trypanosoma cruzi*

A doença de Chagas é transmitida tanto para os animais como para os humanos através de fezes de triatomíneos. Os triatomíneos pertencem à ordem Hemiptera, família *Reduviidae* e subfamília *Triatominae* (Bustamante *et al.*, 2016).

São conhecidas 150 espécies de triatomíneos pertencentes a 18 géneros, dos quais 14 ocorrem no novo mundo. Estão distribuídos por todo o continente americano, desde o sul dos Estados Unidos da América até Chile e Argentina (Gourbière *et al.*, 2011).

O estudo de triatomíneos tem sido um grande foco para os cientistas devido ao seu impacto clínico e na saúde pública. As espécies com maior importância e que transmitem a doença para o humano são do género *Triatoma*, *Rhodnius* e *Pastrongylus*. No entanto, *Triatoma infestans*, *Triatoma dimidiata*, *Triatoma brasiliensis*, *Rhodnius prolixus* e *Pastrongylus megistus* são considerados os vetores primários da transmissão de *T. cruzi* como demonstrado na figura 6 que ilustra a dispersão das diferentes espécies na América Latina (Galvão *et al.*, 2015, Pereira *et al.*, 2013).

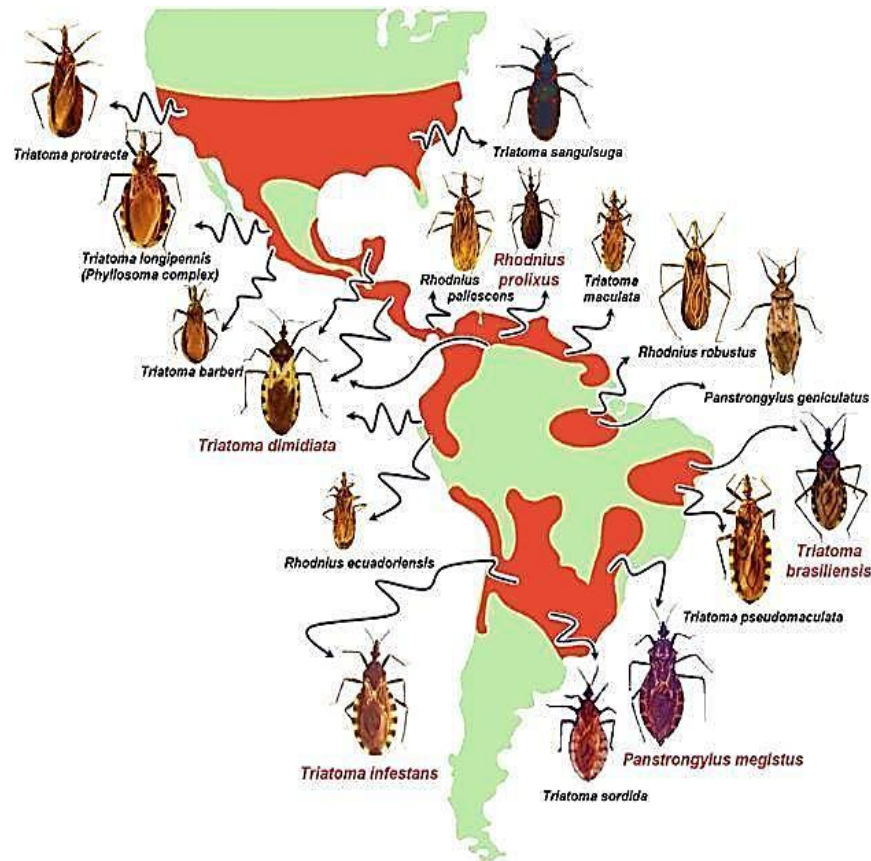


Figura 6. Distribuição das espécies de triatomíneos na América Central e na América do Sul. Extraído de Gourbière *et al.*, 2011

Os insetos têm hábitos alimentares noturnos, permanecendo durante o dia em locais não visíveis e secos. Encontram-se geralmente em ambientes rurais, tais como: interiores dos domicílios (colchões, sofás, etc) e regiões peridomiciliares (Rozendal, 1997).

O ciclo de vida dos triatomíneos envolve obrigatoriamente uma refeição sanguínea para o desenvolvimento do adulto, passando por cinco estádios de ninfas desde a eclosão até o estágio adulto. Durante a noite sai à procura da refeição sanguínea para se alimentar e no final do repasto o seu estômago comprime-se, expelindo as fezes e urina, infectando o hospedeiro com tripomastigotas (Mehlhorn, 2011; Lazzari, 2009).

O controle e prevenção da doença de Chagas têm sido maioritariamente físicos e químicos. Os programas consistem na pulverização das habitações e dos lugares peridomiciliares, que favorecem a colonização de triatomíneos, com inseticidas residuais de longa duração (Rozendal, 1997; Silva *et al.*, 1998).

Ao longo dos anos, a utilização do controlo através de agentes químicos tem sido muito limitado devido às resistências dos insetos. Para alternativas mais avançadas, nomeadamente, a utilização de *Triatoma virus* como agente biológico gerou enormes progressos devido às características destas partículas virais (Querido *et al.*, 2015).

1.3 Doença de Chagas

1.3.1 Epidemiologia

A doença de Chagas, também designada por Tripanossomíase Americana, é considerada uma infeção crónica ou aguda causada pelo protozoário flagelado *T. cruzi*. Estima-se que 7 milhões de pessoas do mundo estão infetadas com *T. cruzi* e mais de 25 milhões estão em risco de infeção. A doença mata sete mil pessoas por ano, considerando-se por isso um grande problema de saúde pública devido à reduzida possibilidade de tratamento nas fases iniciais da infeção (WHO, 2015).

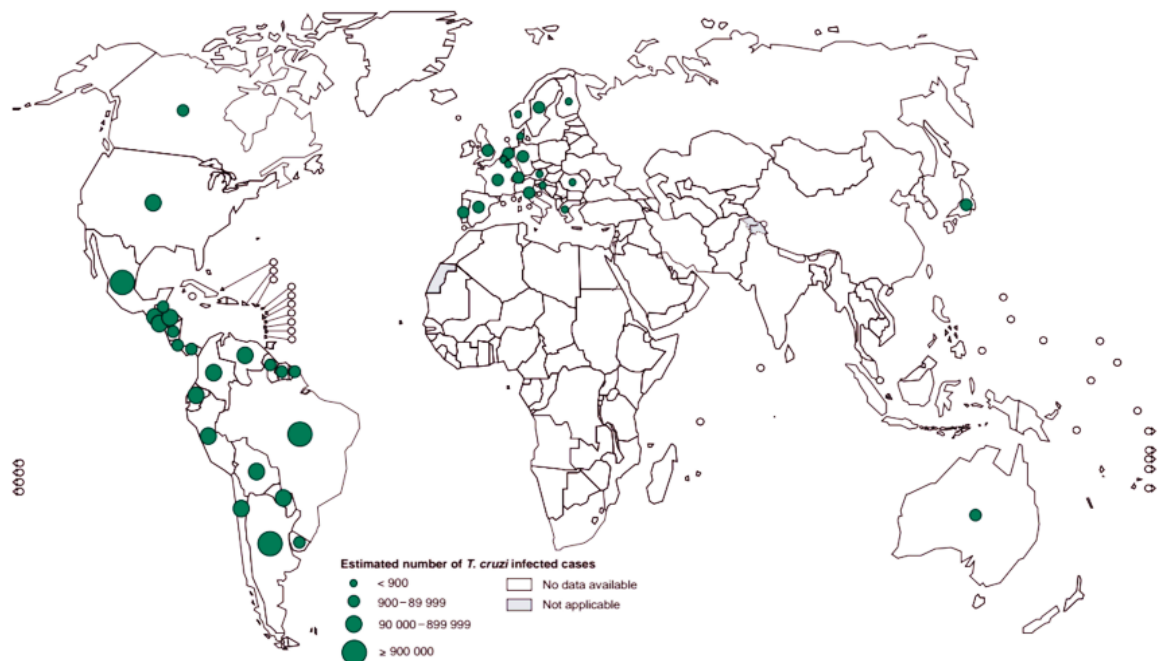


Figura 7. Distribuição da doença de Chagas reportada pela OMS. Extraído de WHO, 2015.

A figura 7 demonstra que os países mais afetados pertencem à América Latina (Pereira & Navarro, 2013). No entanto, outros países não endêmicos na Região das Américas (Canadá e Estados Unidos), na Região do Oeste do Pacífico (Austrália e Japão) e na Região Europeia (Bélgica, Espanha, França, Itália, Reino Unido, Suíça, Alemanha, Áustria, Croácia, Dinamarca, Holanda, Luxemburgo, Noruega, Portugal, Roménia e Suécia). Todos estes países estão em estado de alerta devido ao recente fluxo dos migrantes provenientes das regiões endémicas (WHO, 2015).

1.3.2 Apresentação clínica da doença de Chagas

Após a penetração do parasita no organismo humano, dão-se duas etapas de desenvolvimento da infeção, a fase aguda e a fase crónica. O período de incubação normalmente ocorre entre 5 a 14 dias se a infeção ocorreu através das fezes de triatomíneo (WHO, 2012). A infeção aguda é detetada em apenas 2% dos indivíduos infetados. Nesta fase o parasita é facilmente localizado no sangue. Após a picada do inseto a área da pele pode torna-se avermelhada e inchada, designada por chagoma de inoculação correspondendo a uma formação cutânea eritematosa. Se a picada estiver localizada junto ao olho ocorre a formação do edema bipalpebral ou sinal de Romaña (Figura 8A). Para além deste sinal, os sintomas podem apresentar-se sob a forma de febre, dores de cabeça, mal-estar, anorexia, mialgia, fraquezas, náuseas e diarreia (Neves, 2004). A fase aguda é muitas das vezes seguida por uma fase indeterminada. Nesta fase o parasita tem tendência a desaparecer. Apesar das estimativas, aproximadamente 70% a 90% dos doentes são assintomáticos. Contudo, a maior parte dos pacientes entra na fase crónica passado entre 5 a 15 anos após a infeção (WHO, 2012).

A fase crónica é representada pela falência dos órgãos, geralmente do coração e sistema digestivo. O distúrbio cardíaco é uma das manifestações clínicas mais frequentes. Esta caracteriza-se por arritmias, aneurismas apicais, embolismo pulmonar e anomalias na condução elétrica; já a falência do sistema digestivo apresenta-se sob a forma de megacólon e megaesófago causado pela inflamação e destruição dos neurónios parassimpáticos (Figura 8B) (Junqueira *et al.*, 2010; Coura, 2015).

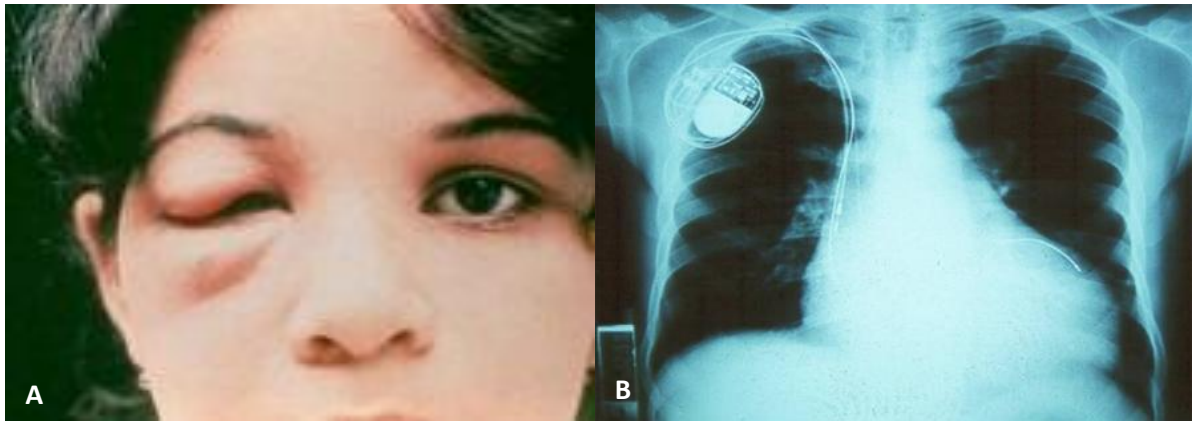


Figura 8. A figura A representa a evolução aguda (sinal de Romaña). A figura B representa a evolução crónica (distúrbio cardíaco). Extraído de Coura, 2015.

1.3.3 Aspetos imunológicos da doença de Chagas

O sistema imunológico representa um papel crucial no combate a microrganismos invasores. A função imunológica é dividida em imunidade inata e imunidade adquirida/adaptativa (Delves & Roitt, 2000). A parte da imunidade inata apresenta uma resposta rápida, constituída por barreiras físicas, químicas e biológicas. Os constituintes principais da imunidade inata são: macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células NK (do inglês *Natural Killer*) (Castelo-Branco & Soveral, 2013). Estas células contêm na sua constituição recetores (PRRs) que por sua vez são capazes de detetar e reconhecer as moléculas associadas ao *T. cruzi* (PAMPs). Posteriormente, da ligação entre os recetores resulta uma resposta por parte dos macrófagos, promovendo a produção da IL-12 e estimulando assim a síntese de INF- γ pelas células NK. No entanto, a produção de INF- γ promove novamente a produção de IL-12, TNF- α e NO (Óxido Nítrico), que contribuem para a eliminação do parasita. Os mecanismos desta imunidade são ativados por estímulos específicos, dando origem à fagocitose, libertação de mediadores inflamatórios, ativação de proteínas do sistema do complemento, síntese de proteínas de fase aguda, citocinas e quimiocinas (Delves *et al.*, 2000).

Durante a evolução, o parasita conseguiu desenvolver diversas estratégias para evadir o sistema imunitário do hospedeiro. As formas infantas, tripomastigotas metacíclicas têm preferência pelos macrófagos, fibroblastos e outros tecidos mesenquimais. Com ajuda de proteases da superfície é possível a digestão enzimática que permite a sua internalização (Figura 9). Esta digestão desempenha um papel importante na infecção celular, facilitando a passagem através do endotélio (De Souza *et al.*, 2010; Nagajyothi *et al.*, 2012).

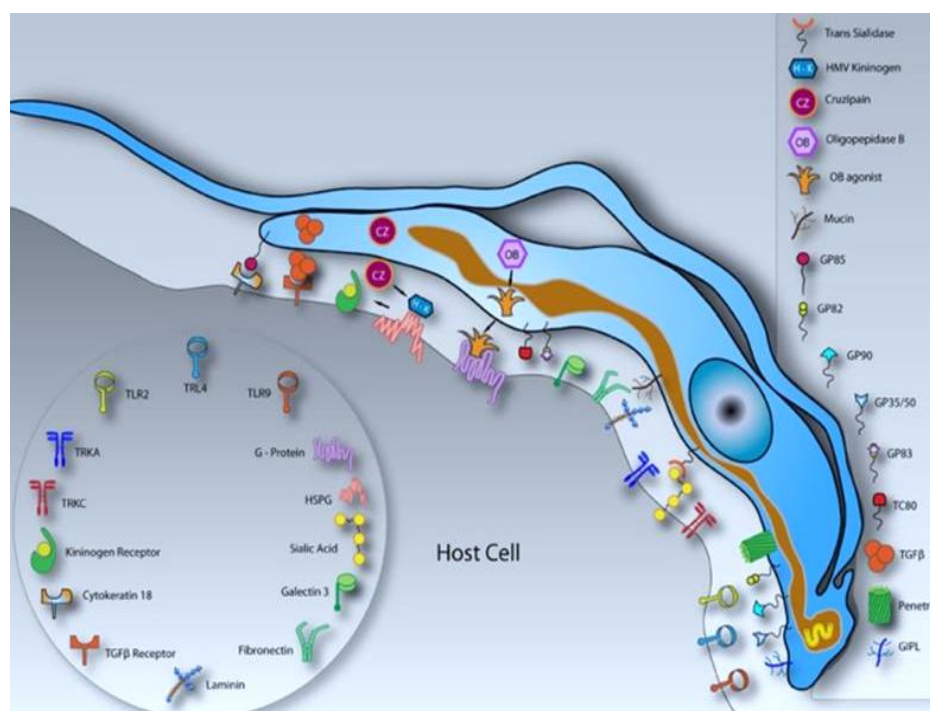


Figura 9. Moléculas envolvidas no processo de adesão e invasão celular de *T. cruzi*. Extraído de Barrias *et al.*, 2013.

Para além de proteases existem outras glicoproteínas igualmente importantes, tais como gp82, gp35/50 e gp90. Estas têm como função promover a ligação entre o parasita e a célula hospedeira, provocando uma alteração ao nível do cálcio intracelular (Ca^{2+}) (Fernandes & Andrews, 2012). Esta alteração favorece o processo infeccioso do parasita dentro da célula do hospedeiro (Romano *et al.*, 2012; Epting *et al.*, 2010; Barrias *et al.*, 2013).

Em relação aos macrófagos, os parasitas são interiorizados por mecanismo de fagocitose, envolvendo estruturas como filamentos de actina para criar projeções de membrana (Figura 10). No entanto, nas células não-fagocíticas todos os filamentos são dispensados utilizando apenas a habilidade celular através do mecanismo ativo, ou seja, formando uma pequena depressão o parasita consegue ser internalizado (Morais *et al.*, 2015, Epting *et al.*, 2010; Bryan *et al.*, 2016).

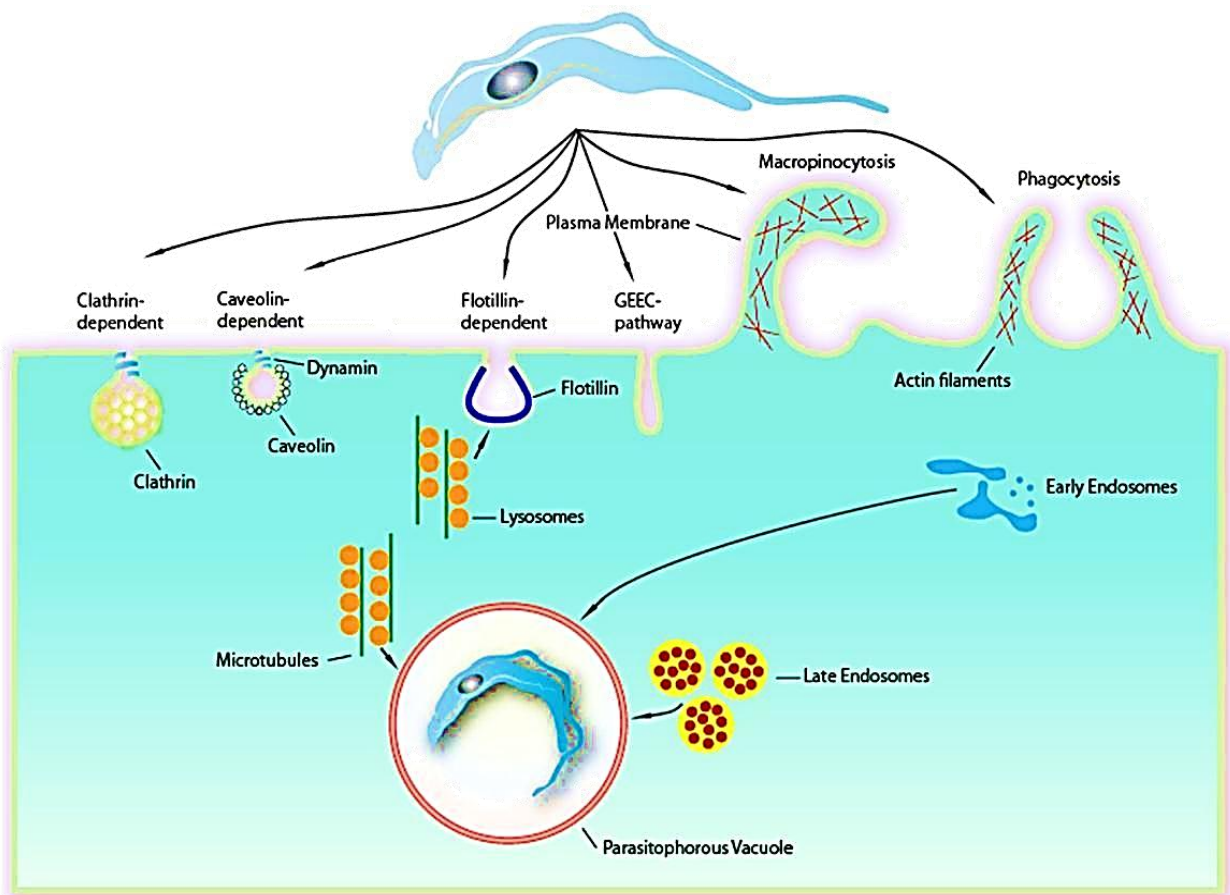


Figura 10. Diferentes mecanismos envolvidos na internalização de *T. cruzi* nas células do hospedeiro. Extraído de Barrias *et al.*, 2013.

Como demonstrado na figura 11 o processo de ativação da defesa imunitária contra *T. cruzi* inicia-se por ativação das células dendríticas, macrófagos e NK, que correspondem às primeiras linhas de defesa, e que posteriormente prossegue para as respostas imunitárias específicas dirigidas pelos linfócitos T e B (Teixeira *et al.*, 2011). A imunidade adquirida depende de um estímulo específico, como por exemplo dos linfócitos. Esta tem como características principais a especificidade e diversidade de reconhecimento, memória, autolimitação e tolerância. Para além dos linfócitos, as células apresentadoras de antígenos desempenham igualmente uma função essencial que por sua vez ativam os linfócitos através da apresentação dos antígenos acopladas ao complexo principal de histocompatibilidade (do inglês *Major Histocompatibility Complex*) (Cruvinel *et al.*, 2010).

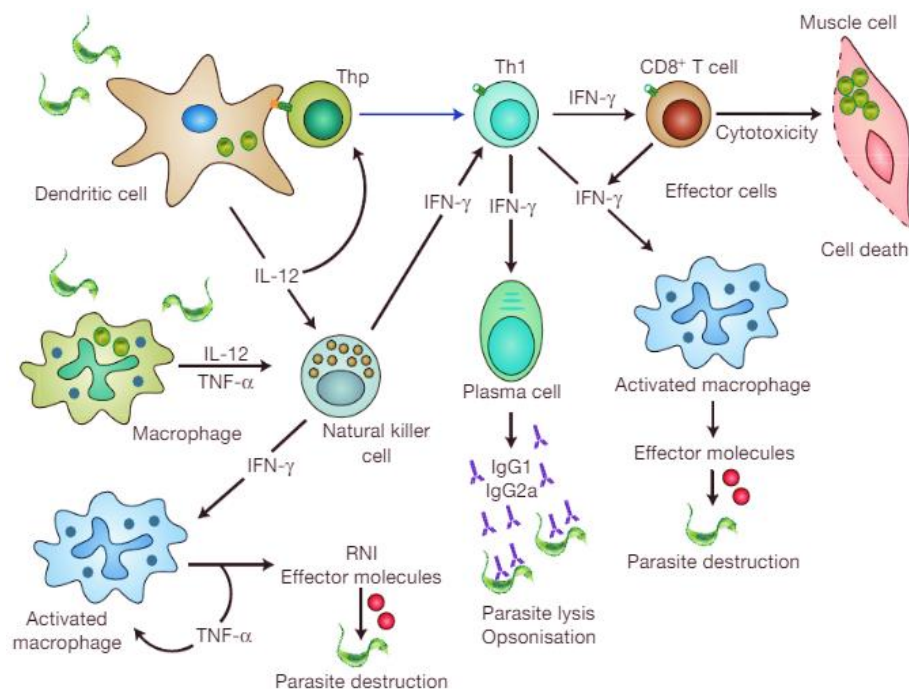


Figura 11. Mecanismos de resposta da imunidade inata e adquirida durante a infecção por *T. cruzi*. Extraído de Junqueira *et al.*, 2010.

As citocinas inflamatórias, juntamente com TNF- α , desencadeiam a ativação de novos macrófagos e processos inflamatórios, controlando deste modo a replicação do parasita. As formas intermediárias reativas de azoto derivadas de macrófagos (RNI) estão diretamente associadas com o controlo da carga parasitária (Teixeira *et al.*, 2011).

A fase aguda é caracterizada maioritariamente pelo recrutamento de células T para os tecidos infetados onde INF- γ apresenta um papel crucial, induzido pela produção de citocinas. A diferenciação e a expansão das células T CD4⁺ e CD8⁺ que resultam da produção da IL-12 tendem a desencadear efeitos citotóxicos, nomeadamente pelas células CD8⁺ (Andrade *et al.*, 2014).

Por outro lado, as células efetoras T CD4⁺ estimulam a proliferação das células B e consequentemente a produção de anticorpos que irão provocar lise do parasita. As células T CD4⁺ estão também relacionadas com a ativação imunológica dos macrófagos infetados e com a destruição intracelular de parasitas por células do tipo Th1 (células Linfócitos *T helper*), produtoras de INF- γ e do tipo Th2, produtoras de anticorpos líticos (Figura 11) (Cardoso *et al.*, 2016, Andrade *et al.*, 2014).

As células Th diferenciam-se a partir da célula naiva CD4 e subdividem-se em 4 grandes linhagens: Th1, Th2, Th17 e T reguladoras (Treg). Após o estímulo da célula naiva CD4, esta produz IL-2, a maior citocina que estimula o crescimento das células T e aumenta a produção de novas citocinas tais como INF- γ e IL-4 (Araújo-Jorge & Castro, 2000).

No que diz respeito às células B, várias observações realizadas durante a infeção aguda nos animais sugerem fortes evidências da presença de altos níveis de IgM, IgG, IgG1, IgG2 ou IgG3. Contudo, os anticorpos com maior prevalência são da subclasse IgG2, particularmente IgG2a, sugerindo que os da classe de IgM e subclasse IgG1 quase não conferem proteção (Boscardin *et al.*, 2010).

MHC tal como referido anteriormente, apresenta uma função importante na regulação da resposta imunitária. Este complexo tem como finalidade ligar os antígenos aos linfócitos T CD8⁺ e apresentar os antígenos aos linfócitos T CD4⁺. MHC humano é dividido em duas classes: I (HLA-A, HLA-B, HLA-C) e II (HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP) (do inglês *Human Leukocyte Antigen*). Por outro lado, nos animais (murganhos) os genes das respetivas classes são denominadas por I (H-2K, H-2D, H-2L) e II (I-A, I-E) (Marañón *et al.*, 2011).

1.3.4 Diagnóstico laboratorial da doença de Chagas

O diagnóstico laboratorial para a doença de Chagas é estabelecido na base da observação do parasita nos tecidos afetados ou através da detecção dos anticorpos produzidos pelo sistema imune ou dos produtos de secreção do parasita no sangue. Na era das novas tecnologias e avanços ao nível da biologia molecular foi possível detetar o DNA de *T. cruzi*, contudo este método não apresenta grande sensibilidade (Schijman, 2011; Bern, 2015).

Existem vários métodos para o diagnóstico laboratorial da doença de Chagas. Na fase aguda da doença o parasita pode ser detetado através de métodos parasitológicos diretos, ou seja, os parasitas são identificados diretamente no exame de sangue do doente. É um método que consiste em 70% de sensibilidade, se o mesmo for realizado durante a fase aguda da doença, e 100% de especificidade (Schijman, 2011; WHO, 2013).

Na fase crónica, o diagnóstico pode ser realizado através do método parasitológico indireto, no caso do PCR (do inglês *Polymerase chain reaction*) para amplificar sequências específicas de DNA do parasita. Este apresenta uma sensibilidade de aproximadamente 60% a 100% (WHO, 2013).

No caso dos métodos serológicos, estes têm por base três tipos convencionais de testes: hemaglutinação indireta (HAI), imunofluorescência indireta (IFI) e ELISA (do inglês *Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*) (Chirinos & Velarde, 2006). A sensibilidade destes é entre 94% a 99,5%, e a especificidade varia entre 94% e 96%. Apresentam-se intervalos de valores pois os mesmos dependem do *kit* utilizado (WHO, 2013).

HAI baseia-se na aglutinação dos eritrócitos sensibilizados com antígeno de *T. cruzi* na presença do soro que contém anticorpos contra o parasita (Luquetti *et al.*, 1998).

IFI é uma técnica que utiliza por base antígenos do parasita, que são fixados na lâmina sobre a qual, posteriormente, é realizada a reação. A formação do complexo antígeno-anticorpo primário é revelado com antiglobulina humana (anticorpo secundário) marcada com uma molécula fluorescente (Luquetti *et al.*, 1998).

ELISA é um ensaio imunoenzimático que se baseia na reação antigénio-anticorpo, permitindo deste modo detetar os anticorpos específicos produzidos contra o parasita no soro (Luquetti *et al.*, 1998).

1.3.5 Opções terapêuticas para o tratamento da doença de Chagas

Durante a infeção por *T. cruzi*, o principal objetivo do tratamento é eliminar o parasita, diminuindo assim a probabilidade da evolução da doença. Desde há muitos anos que estão a ser testados vários medicamentos para impedir a transmissão da doença. Foram aplicadas várias estratégias terapêuticas para descobrir novos tratamentos desde o ajustamento da dosagem da medicação, terapias combinadas e pesquisa de novos alvos para combater a infeção (Bahia *et al.*, 2014).

Para além das estratégias aplicadas, o tratamento também depende de vários fatores, nomeadamente da fase da infeção em que o tratamento é administrado, da idade do paciente e da região geográfica onde o indivíduo foi infetado (WHO, 2012).

Atualmente existem apenas dois fármacos eficazes para a doença de Chagas: Nifurtimox introduzido em 1960 pelo Bayer e Benzonidazol pela Roche em 1970. Segundo os estudos, ambos apresentam maior eficácia nos recém-nascidos (probabilidade de cura de 99%) e na fase aguda (probabilidade de cura de 80%) do que na faixa etária dos 50 anos e durante a fase crónica, sendo pouco eficazes nesta fase (Sosa-Estani *et al.*, 1998; Bern, 2015).

A duração do tratamento é bastante prolongada, uma vez que dura 60 dias, e apresenta efeitos secundários, tais como distúrbios gastrointestinais, anorexia, mialgias, entre outros (Cortez *et al.*, 2012).

O estudo conduzido pelo projeto BENEFIT, que teve como objetivo testar se a terapêutica (Benzonidazol) contra *T. cruzi* influencia a mortalidade e o prognóstico dos doentes com cardiomiopatia chagásica levou, em 2015, à conclusão de que o tratamento durante a cardiomiopatia chagásica reduziu significativamente a deteção do parasita circulante. No entanto, o mesmo não demonstrou qualquer melhoria na regressão da patologia cardíaca (Morillo *et al.*, 2015).

Dadas as reações adversas dos fármacos anteriormente mencionados, alguns ensaios clínicos foram avançando para encontrar um medicamento ou formulação que seja mais eficaz com baixa toxicidade.

Os fármacos formulados com antifúngicos triazóis (posaconazol, ravuconazol, voriconazol) são inibidores da biossíntese da ergosterol, essencial para a sobrevivência, crescimento, desenvolvimento e proliferação *in vitro* de *T. cruzi*. Segundo vários estudos, determinados antifúngicos podem induzir cura parasitológica, demonstrado nos murganhos com infecções agudas e crônicas sob ação do posaconazole. O fármaco apresenta algumas barreiras, como os custos e complexidade de produção (Morillo *et al.*, 2015).

Os estudos atuais apontam que, para além dos fármacos que inibem a biossíntese do ergosterol, os compostos nitroheterocíclicos (Nitroimidazol Fexinidazol), inibidores CYP51 (C14-alfa-demetilase), inibidores de cruzipaina (K777 Vinyl Sulfone) e algumas arilimidamidas relacionados com pentamidinas (DB766) são futuros candidatos para o tratamento da doença de Chagas (Bahia *et al.*, 2014).

Recentemente demonstrou-se que a associação dos fármacos aos diferentes mecanismos de ação poderão ajudar a encontrar novas vias de tratamento. No caso do método baseado nas partículas nanotransportadoras, este permite uma maior permeabilidade, segmentação do parasita em diferentes fases da infecção. A figura 12 demonstra a ação dos fármacos baseados em partículas nanotransportadoras. Estas são capazes de interagir com a membrana celular através da endocitose, micro e macropinocitose sendo libertados para o citoplasma. Durante a fase aguda (lado esquerdo da figura 12) os tripomastigotas são abundantes na circulação o que permite às nanotransportadoras atingirem o parasita devido à sua elevada semi-vida. Por outro lado, as nanotransportadoras são facilmente fagocitadas alcançando as formas amastigotas nos macrófagos. Durante a fase crônica (lado direito da figura 12), o papel das nanotransportadoras é fundamental, visto que estas conseguem alcançar locais inacessíveis (como tecido cardíaco onde se encontram as formas amastigotas) devido ao seu fácil reconhecimento pelas células (Bahia *et al.*, 2014).

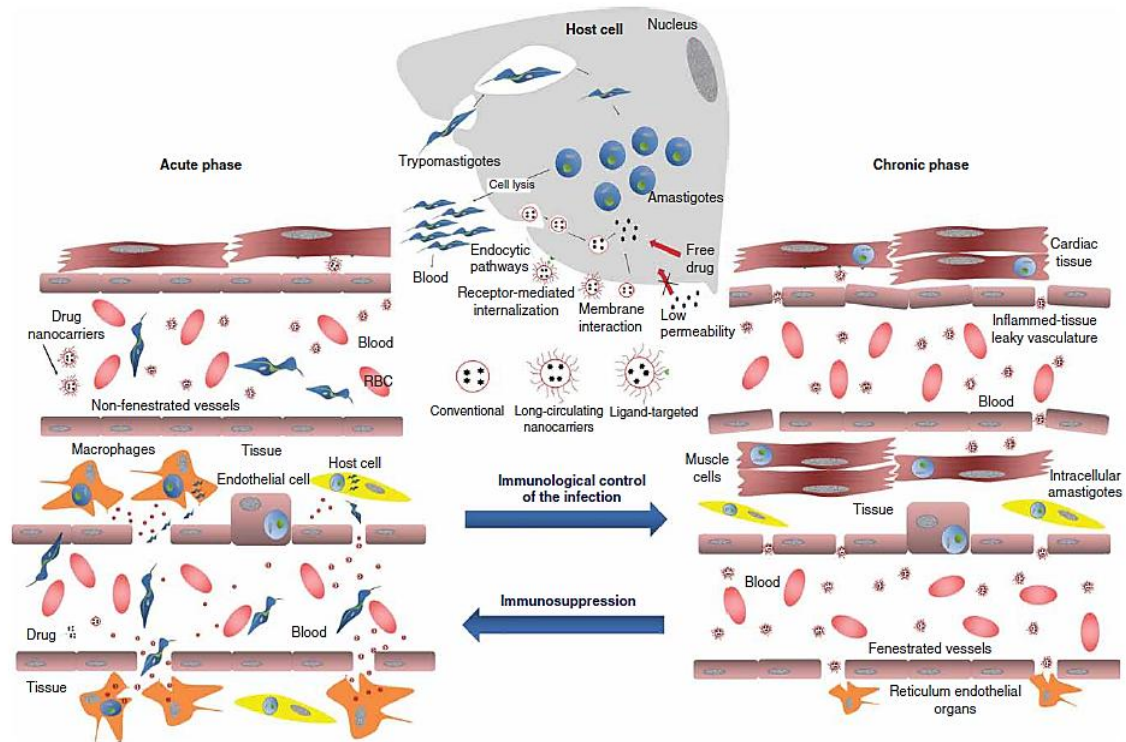


Figura 12. Representação esquemática da aplicação da terapêutica de *T. cruzi* com utilização das partículas nanotransportadoras nas diferentes fases de infecção. Parte central da figura representa a célula hospedeira com a invasão das formas tripomastigotas e formação de formas amastigotas do parasita. Extraído de Bahia *et al.*, 2014.

1.3.6 Medidas de controlo e prevenção da doença de Chagas

Desde os anos 50 e 60 os cientistas implementam várias estratégias para controlar a propagação da doença de Chagas. Inicialmente, foi nos anos 80 na Venezuela, Brasil e Argentina que se deu o controlo de transmissão do vetor via congénita analisando as mulheres grávidas e motorizando as crianças. Posteriormente, foi em finais dos anos 90 que começaram os estudos de prevenção da propagação da doença de Chagas transportadas por pessoas oriundas das áreas endémicas através de triagens sanguíneas (Sosa-Estani & Segura 2015; WHO, 2012).

Para além das estratégias mencionadas anteriormente, o impedimento da colonização dos vetores no setor doméstico com ajuda dos inseticidas e boas práticas de higiene podem ajudar a prevenir a transmissão da infeção (Vigilância em saúde, 2009).

Desde 1991, a PAHO (Organização Panamericana de Saúde), juntamente com a OMS, têm contribuído para os estudos da eliminação do vetor da doença de Chagas.

O grupo que poderá estar mais em risco são os profissionais de saúde que lidam diretamente com o agente patogénico em causa. Os técnicos de diagnóstico e terapêutica, os enfermeiros e médicos devem ter especial atenção usando equipamento da proteção individual. O material cortante contaminado com sangue deve ser descartado de forma adequada (Sosa-Estani & Segura, 2015; WHO, 2010; Vigilância em saúde, 2009).

A estratégia que aparenta ter melhores resultados no impedimento da evolução da doença de Chagas consiste na vacinação. Embora já tenham sido testadas inúmeras vacinas experimentais, avaliadas em diferentes modelos animais, as mesmas ainda não foram aplicadas aos humanos (Vigilância em saúde, 2009).

1.4 História do desenvolvimento de vacinas contra *Trypanosoma cruzi*

A primeira vacina foi desenvolvida por Edward Jenner em 1796 contra a doença da varíola. Esta era constituída por um pequeno vírus atenuado (*cowpox*), muito semelhante ao vírus *smallpox* que gerava imunidade sem causar doença grave. A designação “vacina” deriva de *Variolae vaccinae*, sendo a varíola dos bovinos (Malone, 2007). Mais tarde Louis Pasteur em 1885 desenvolveu uma vacina eficaz contra a raiva humana causada por *Rabies virus* (RABV) (Hiks, 2012). O vírus da raiva é neurotrópico que atua no sistema nervoso central (SNC). Pertence ao género *Lyssavirus*, da família *Rhabdoviridae* (Hiks, 2012; Normas, 2011; Castilho *et al.*, 2010).

Existem diferentes tipos de vacinas. Algumas podem ser constituídas por vírus atenuados, inativados ou alterados, outras têm na sua constituição organismos vivos inativos ou mortos, toxinas inativas ou partes do microrganismo (vacinas conjugadas) (Plotkin, 2014; Ma, 2015; WHO, 2009; UNICEF, 2009).

As vacinas vivas atenuadas são obtidas a partir do isolado de microrganismo e o processo da sua produção consiste em passagens sucessivas em meios de culturas celulares. O objetivo destas consiste na redução da infetividade do próprio vírus (Ma, 2015).

As vacinas mortas ou inativas são produzidas através da inativação do próprio microrganismo, mediado por calor ou produtos químicos. O formaldeído ou formalina têm efeitos extraordinários, visto que destroem a capacidade de replicação do patógeno em causa, mantendo-o inato para que o sistema imune o possa reconhecer (Plotkin, 2013).

As vacinas produzidas através das toxinas inativas ou toxóides vêm das toxinas bacterianas. Estas por sua vez também poderão ser consideradas como vacinas mortas ou inativas porque sofrem o mesmo processo de inativação que as vacinas anteriormente mencionadas (Plotkin, 2014).

Por fim, as vacinas conjugadas contêm na sua constituição partes do próprio microrganismo, que posteriormente são apresentadas às células do sistema imunitário, provocando assim uma boa e rápida resposta imune (UNICEF, 2009).

Por meio de engenharia genética foi possível criar um outro tipo de vacinas. É utilizado um outro vírus para inserir o código genético numa determinada proteína. Assim, quando o vírus se reproduz, este vai proporcionar a produção da proteína inserida tendo por fim uma vacina recombinante, neste caso temos o exemplo da vacina contra vírus da hepatite B (UNICEF, 2009).

Outro exemplo da vacina recombinante é do vírus do papiloma humano que usa partículas virais (*VLP-virus like particles*) que não contêm material genético, mas que proporcionam uma alta imunogenicidade e rápida resposta imune.

Ao longo dos anos foram efetuadas várias tentativas com o objetivo de garantir a proteção contra o parasita *T. cruzi*. Todo o processo de desenvolvimento de vacinação iniciou-se pelas experiências do Blanchard em 1912 que demonstraram que animais sobreviventes de infeção aguda com *T. cruzi* ficavam resistentes a infeção. Estas experiências foram confirmadas nos estudos de Brumpt, Mayer e Rocha-Lima em que utilizaram as formas sanguíneas de *T. cruzi* (Rodríguez-Morales, 2015). Mais tarde, no ano de 1952, os cientistas Pizzi e Prager pela primeira vez usaram culturas do parasita atenuado para proteger os animais contra as estirpes virulentas (Rodríguez-Morales,

2015). No entanto, o cientista Menezes em 1968 demonstrou que os fatores de virulência de *T. cruzi* não apresentam qualquer impacto na imunização e proteção dos animais (Rodríguez-Morales, 2015).

O desenvolvimento de vacina para *T. cruzi* não tem sido uma tarefa fácil. O progresso tem sido lento devido à controvérsia da etiologia autoimune e ao desinteresse por parte das autoridades dos países onde a doença de Chagas prevalece. Para além disso, a grande complexidade genética do parasita também contribui para este atraso no progresso (Beaumier *et al.*, 2016).

Para o desenvolvimento das vacinas são utilizados os antígenos do próprio *T. cruzi* das formas intracelulares (amastigota) e extracelulares (tripomastigota) (Rodríguez-Morales, 2015).

Muitos dos estudos para o desenvolvimento das vacinas têm sido baseados em diferentes antígenos. Na tabela 1 é possível observar diferentes tipos de vacinas que já foram testados em murganhos. Estas vacinas têm demonstrado bons resultados frente à imunização nos modelos animais (Dumonteil, 2004; Dumonteil, 2007; Quijano-Hernandez, 2011; Arce-Fonseca, 2015).

Tipo de vacina	Antígenos utilizados	Resposta imune	Parasitêmia
Parasita inteiro	<i>T. cruzi</i> vivo atenuado	Não reportado	Diminuição
Proteínas recombinantes	CRA FRA PFR HSP70	Aumento de IFN- γ	Diminuição
Vacinas de DNA	TcSP TcSSP TcVac3 ASP-2 TSA-1 Tc24	Resposta humoral e celular, INF- γ , CD8+, atividade citolítica	Diminuição

Tabela 1. Diferentes tipos de vacinas testadas contra *T. cruzi*.

1.4.1 *Heat-shock Protein 70 (HSP70)* como candidato antigénico para vacina contra *T. cruzi*

As proteínas de choque ou as chamadas HSP (do inglês *Heat-shock protein*) são um grupo de proteínas induzidas pelo *stress* térmico. Estas têm como função, para além da síntese proteica: a montagem, desdobramento e degradação de proteínas (Castro, 2013). As HSP são encontradas nos seres procariotas (bactérias) e nos eucariotas (desde leveduras até primatas). Estas proteínas são agrupadas de acordo com as sequências de aminoácidos e com o seu peso molecular em seis famílias: HSP pequenas, HSP40, HSP60, HSP70, HSP90 e HSP100 (Castro, 2013).

Segundo determinados estudos, HSP70 de *T. cruzi* apresenta-se como um dos antigénios mais abundantes, existindo um alto nível de anticorpos contra o mesmo durante a infeção no humano. Provou-se também que HSP70 de *T. cruzi* consegue induzir uma proteção imune, devido à interação com as células apresentadoras de antigénios (Flechas, 2009). Estas ativam as células do sistema imune, como por exemplo os linfócitos T citotóxicos CD8+ que, por sua vez, são ativados na presença de macrófagos através da secreção de INF- γ e TNF- α (Morell, 2006). Deste modo também se confirma que as HSP70 têm uma interação direta com MHC (Planelles, 2001).

Os estudos realizados por Marañon e colaboradores (2011) certificam que o candidato antigénico HSP70 apresenta uma alta imunogenicidade, oferecendo uma boa proteção no modelo animal (murganhos). Contudo, foram identificados quatro epitopos mais imunogénicos de HSP70 limitado à molécula HLA-A*02:01, sendo o alelo mais prevalente das moléculas HLA classe 1 na população da América Latina. Estes são processados e apresentados durante a infeção por *T. cruzi* (HSP70₂₁₀₋₈, HSP70₂₅₅₋₆₃, HSP70₃₁₆₋₂₄ (TLQPVERVL) e HSP70₃₄₅₋₅₃). Destes epitopos apenas dois (HSP70₃₄₅₋₅₃ e HSP70₂₅₅₋₆₃) eram reconhecidos por animais imunizados e os dois restantes eram reconhecidos por animais infetados (HSP70₃₁₆₋₂₄ (TLQPVERVL) e HSP70₂₁₀₋₈). Nos estudos paralelos com os soros dos pacientes com doença de Chagas, os epitopos HSP70₃₁₆₋₂₄ (TLQPVERVL) e HSP70₂₁₀₋₈ foram igualmente reconhecidos, sugerindo uma forte possibilidade destes serem uma ferramenta essencial para monitorizar a resposta dos linfócitos T CD8+ (Marañon *et al.*, 2011).

Em resumo, devido à sua alta afinidade com a molécula HLA da classe I (HLA-A*02:01) sugere-se que HSP70 pode ser usada como alvo na indução da atividade das células T citotóxicas (CTL) (Marañon *et al.*, 2011).

1.5 *Virus-like particles (VLPs)*

As VLPs de origem viral são estruturas organizadas e compostas por proteínas virais e não apresentam material genético viral (Chroboczek *et al.*, 2014). Estas contêm propriedades funcionais de um vírus, sendo responsáveis pela penetração celular, assegurando deste modo a entrada na célula em questão (Plimmer & Manchester, 2010). Uma das principais utilidades das VLPs consiste na produção de vacinas, devido à sua alta imunogenicidade. Para além das características que apresentam, estas constituem uma alternativa às vacinas produzidas a partir do vírus infeccioso inativo (Chroboczek *et al.*, 2014).

As partículas virais têm uma grande estabilidade e versatilidade, tendo excelentes capacidades de induzir uma resposta imunitária inata e adquirida. Na figura 13 é possível observar que as VLPs apresentam epítomos de células B e epítomos de células T que são facilmente reconhecidos. Estas também podem ser capturadas pelas células dendríticas e transportadas para os nódulos linfáticos, onde serão processadas, potenciando uma resposta imunitária. Para além disso, as VLPs ainda conseguem ter boa capacidade de apresentação antigénica ao MHC-I e MHC-II (Jennings, 2008).

As VLPs apresentam várias funções desde o transporte de diversos medicamentos, terapia genética e tratamento do cancro. Sendo estas seguras e altamente imunogénicas apresentam uma alternativa às vacinas inativas ou atenuadas (Figura 14) (Yan *et al.*, 2015; Vicente *et al.*, 2011).

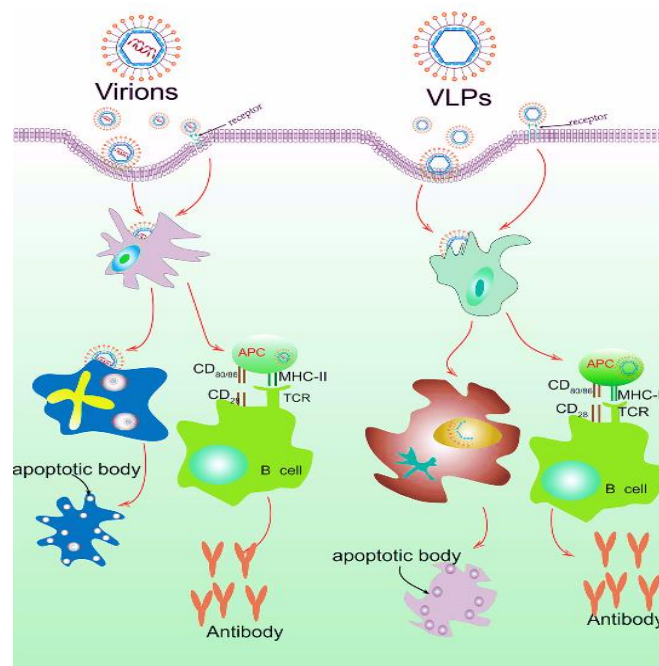


Figura 13. Representação do reconhecimento das VLPs pelas células do sistema imune. Extraída de Yan, 2015.

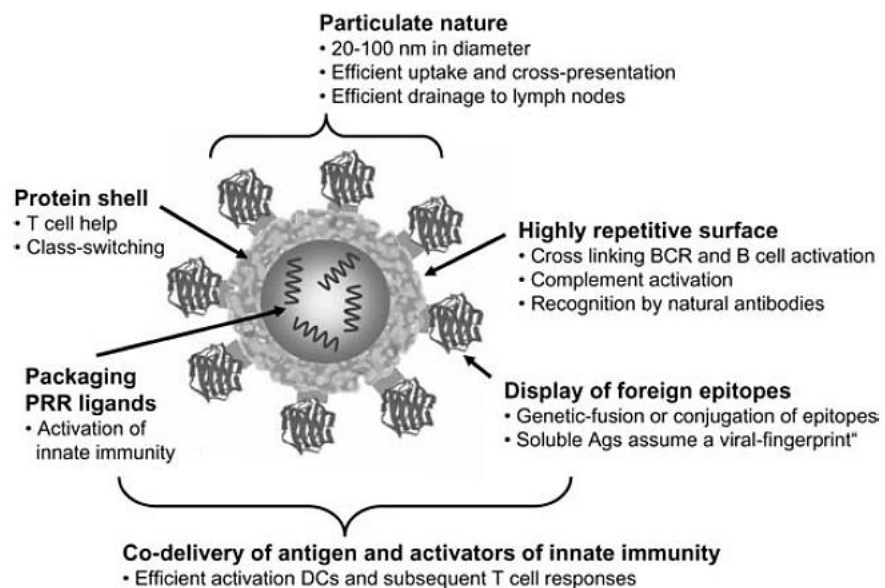


Figura 14. Características imunogênicas da VLP apresentadora de antígenos. Extraído de Jennings, 2008.

Na figura 15 é possível observar a estrutura das VLPs (com ou sem envelope). As VLPs com envelope consistem em proteínas de matriz envolvidas por uma membrana de lípidos com ligação às glicoproteínas (Lua *et al.*, 2014). Já as VLPs sem envelope classificam-se em proteínas virais com cápsides múltiplas ou singulares (Yan *et al.*, 2015).

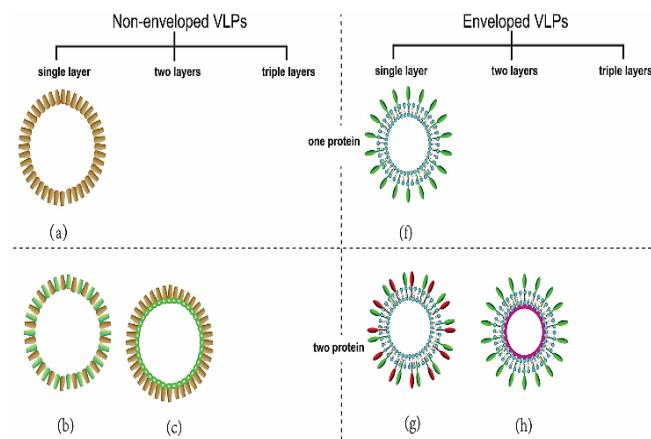


Figura 15. Classificação de diferentes tipos de VLPs baseada no número de proteínas de superfície e existência de envelope. Extraído de Yan, 2015.

As estruturas mais simples são consideradas VLP não envelopadas com uma cápside singular, no caso da vacina de VLP contra o vírus do papiloma humano (VPH). Estas podem ser produzidas em ambos os sistemas de expressão tanto em eucariota como procariota. Por outro lado, as envelopadas são mais complexas na produção sendo necessário o uso de fungos, células de insetos e plantas (Zeltins, 2012; Kushnir *et al.*, 2012; Vicente *et al.*, 2011).

A primeira descoberta da VLP como vacina foi em 1960 quando os cientistas encontraram uma partícula viral do vírus da hepatite B (VHB) que não apresentava qualquer ácido nucleico. Concluiu-se que esta tinha capacidade de induzir imunidade aquando da invasão do VHB, sendo esta aceite para o uso em 1986.

A partir de 1990, os progressos da engenharia genética permitiram que fosse possível expressar e purificar a maior proteína da cápside de VPH que permitisse o tratamento da doença, sendo aprovada para o uso no ser humano em 2006 (Figura 16) (Lua *et al.*, 2014).

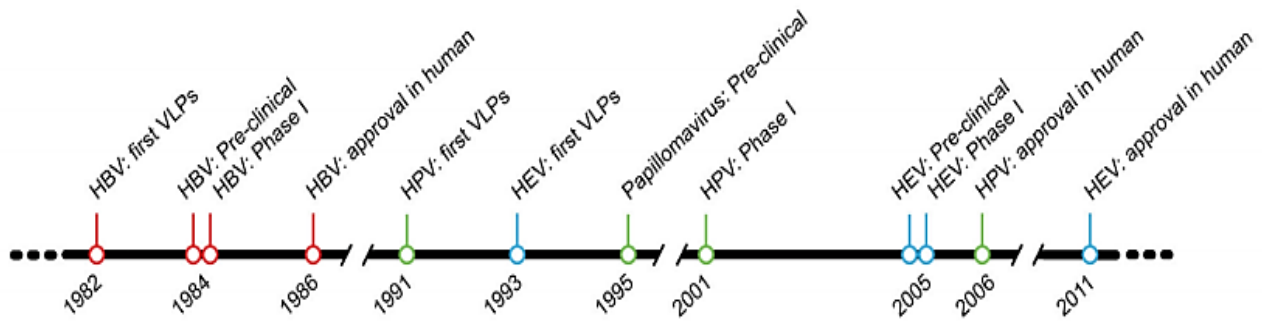


Figura 16. Cronologia dos acontecimentos da história das vacinas baseadas em VLPs. Extraído de Lua, 2014.

A produção das VLPs é um processo muito trabalhoso e minucioso, requerendo essencial cuidado na caracterização e purificação. Sendo a caracterização baseada na análise bioquímica, biofísica e biológica. Qualquer interpretação errada de imunogenicidade das VLPs pode ter impacto no seu desenho e desenvolvimento (Joshi *et al.*, 2013).

Atualmente, com o avanço tecnológico na área de bioinformática é possível realizar novas pesquisas e desenvolver novas vacinas. A análise bioinformática tem sido usada para otimizar a apresentação dos epitopos na superfície das VLPs através da análise estrutural. A escolha correta do sistema de expressão das partículas virais depende da complexidade e imunogenicidade das mesmas. Na tabela 2 apresenta-se a comparação entre vários sistemas de expressão incluindo *Escherichia coli*, fungos, Baculovirus, células mamíferas e plantas (Franco *et al.*, 2010; Lua *et al.*, 2014).

Diversas técnicas são utilizadas na produção das partículas virais com os seus respectivos epítomos. No caso da espectrometria de massa (MS) esta é uma ferramenta indispensável para analisar a sequência proteica, dando informações sobre a massa molecular do analito, e também a composição de aminoácidos (Lua *et al.*, 2014). Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) é essencial para analisar a pureza do analito tal como o Western Blot que permite analisar múltiplas proteínas de cápside da VLP. Por outro lado, a técnica corrente de gel de agarose é utilizada para observar ácidos nucleicos dentro da partícula viral, e analisar a modificação da superfície da VLP em comparação à não modificada. ELISA está presente nos ensaios para verificar a ligação dos anticorpos à VLP.

	<i>E. coli</i>	Fungos	Baculovírus (células inseto)	Células do mamífero	Plantas
Velocidade	++++	+++	++	++	++
Estabilidade	++++	+++	++	++	++
Produtividade	++++	+++	++	+	+
Produtividade reportada	4.38 g/L Poliomavírus VP1	400 mg/L Antigénio da superfície do VHB	662 mg/L Rotavírus VP2, VP6 e VP7	500 mg/L Associações com Adenovírus	3g/kg Papilomavírus L1
Complexidade	+	++	++++	++	+++

Tabela 2. Comparação de diferentes sistemas onde são produzidas VLPs. Extraído e adaptado de Lua, 2015.

A grande diversidade das VLPs proporciona uma oportunidade para o desenvolvimento de plataformas para controlar as doenças através da indução da imunidade. Sendo assim, o principal objetivo deste processo é produzir epítomos antigenicamente semelhantes aos microrganismos em questão graças às tecnologias avançadas (Plummer *et al.*, 2010; Crisci *et al.*, 2012).

1.6 *Triatoma virus* e a produção de *virus-like particles*

Triatoma vírus (TrV) é um vírus que tem capacidade de infectar várias espécies de triatomíneos, nomeadamente *Triatoma infestans* sendo um dos vetores responsável pela transmissão de *T. cruzi* (Squires *et al.*, 2013). TrV é a espécie do género *Triatovirus*, pertencendo à família *Dicistroviridae* estando a sua constituição filogenética apresentada na Figura 17 (ICTV.org).

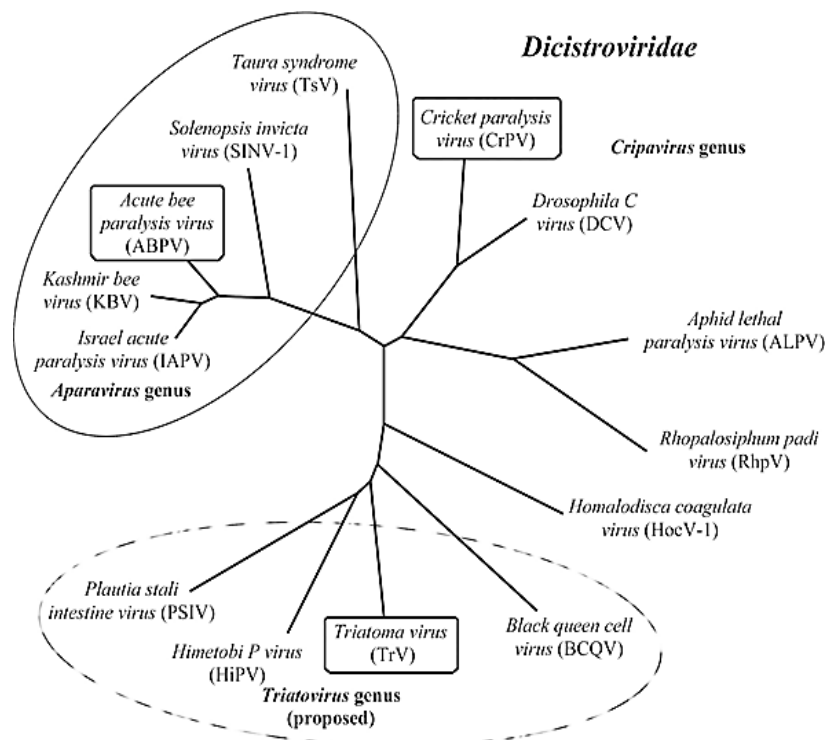


Figura 17. Árvore filogenética de *Dicistroviridae*. Adaptado de Squires *et al.*, 2013.

Inicialmente, segundo as suas características físico-químicas, este era inserido dentro da família *Picornaviridae* devido à sua similaridade com vírus desta família (Muscio *et al.*, 1998; Czibener *et al.*, 2000). As duas famílias são caracterizadas por uma cápside icosaédrica. O genoma é constituído por uma cadeia simples de RNA com sentido positivo (ssRNA+) (Czibener *et al.*, 2000).

A principal diferença que levou à reclassificação deste vírus consiste na sequência genômica. A figura 18 mostra a representação das principais diferenças entre as famílias. Ao contrário da família *Picornaviridae*, o genoma dos vírus pertencentes à família *Dicistroviridae* é constituído por duas ORFs (do inglês *Open Reading Frame*) ORF1 e ORF 2, que por sua vez estão situadas nas extremidades 3' e 5', respetivamente. Em particular a extremidade 5' contém região intergénica (IGR) que separa a ORF 1 da ORF 2 (Czibener *et al.*, 2000). Estas codificam para as proteínas não estruturais (ORF 1) e estruturais (ORF 2) (Czibener *et al.*, 2000).

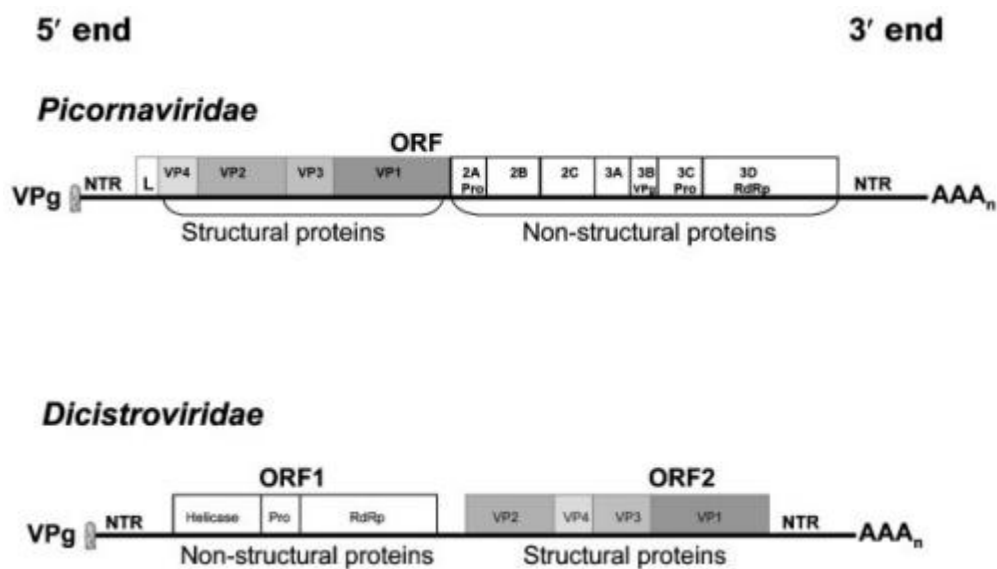


Figura 18. Organização do genoma de Picornaviridae e Dicistroviridae. Extraído de Ongus *et al.*, 2004.

Geralmente, os vírus pertencentes à família *Dicistroviridae* são patogénios dos insetos associados às atividades da agricultura. TrV tem-se considerado um possível biopesticida no combate dos triatomíneos, tais como *Triatoma infestans*, sendo o seu principal hospedeiro (Czibener *et al.*, 2000; Querido *et al.*, 2013; Querido *et al.*, 2015). O virião de TrV tem forma esférica com 30 nm de diâmetro, constituída por uma cápside sem envelope e RNA de cadeia única com sentido positivo (Agirre *et al.*, 2011, Agirre *et al.*, 2013; Squires *et al.*, 2015). Na sua estrutura apresenta proteínas estruturais VP0, VP1, VP2, VP3, e VP4, sendo VP0 a proteína precursora de VP3 e VP4 (Figura

19) (Czibener *et al.*, 2000; Agirre *et al.*, 2011). Para além disso, a proteína estrutural com a baixa massa molecular VP4 é responsável pela entrada do vírus dentro da célula hospedeira, permitindo a libertação do RNA viral (Sánchez-Eugenia *et al.*, 2015a; e 2015b). Por fim, as proteínas não estruturais são constituídas por RNA helicase, protease de cisteína 3C e RdRp (Czibener *et al.*, 2000).

A replicação do vírus ocorre no epitélio intestinal do triatomíneo, provocando paralisia, atrasos no desenvolvimento, redução de fertilidade e morte no hospedeiro. A principal via de transmissão é fecal-oral, canibalismo ou infeção transovariana (Muscio *et al.*, 1998).

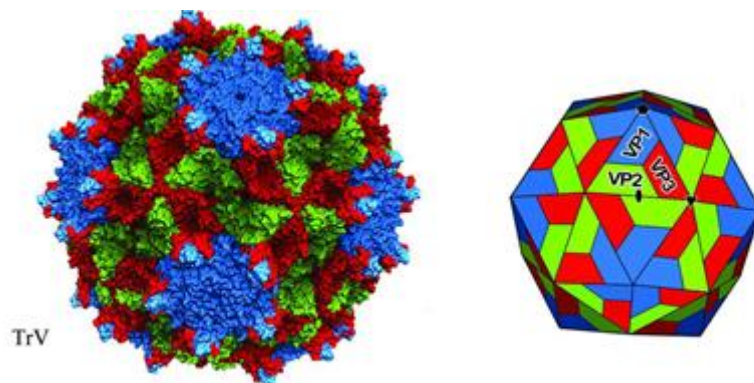


Figura 19. Estrutura do virião de *Triatoma* vírus. A proteína VP4 encontra-se no interior da cápside em contacto com o genoma/RNA. Extraído de Squires et al., 2013.

A ideia da utilização das VLPs de *Triatoma* vírus como um candidato para o desenvolvimento da vacina contra a doença de Chagas tem sido reforçada através da completa sequenciação do genoma de TrV. Para além disso, os estudos realizados pelo Querido e colaboradores em 2015 indicam que o *Triatoma* vírus só consegue completar o seu ciclo de replicação nos triatomíneos, excluindo o risco de infeção para mamíferos. Surgindo a hipótese da utilização da mesma como ferramenta de controlo biológico, nomeadamente, bioinseticida. Outra vantagem do vírus consiste na sua constituição, apresentando 3 proteínas estruturais que, por sua vez, podem ser modificadas de forma independente possibilitando a inserção de diferentes peptídeos em estudo.

2. Objetivos

2. Objetivos

As vacinas são de grande importância para a saúde pública, uma vez que conferem proteção contra doenças infecciosas causadas por agentes patogênicos no Homem. Existem inúmeros tipos de vacinas. Algumas são constituídas por vírus atenuados, inativados ou alterados, outras têm na sua constituição organismos vivos inativos ou mortos, toxinas inativas ou partes do microorganismo (vacinas conjugadas). Têm sido desenvolvidas estratégias de vacinação alternativas, tais como o uso de proteínas recombinantes, peptídeos sintéticos e DNA, de modo a superar algumas desvantagens das vacinas anteriormente apresentadas.

Neste trabalho, apenas serão abordadas as vacinas de VLPs de TrV, nomeadamente, as vacinas contra *Trypanosoma cruzi* com sequências antigénicas do próprio parasita.

As VLPs não possuem capacidade de replicação, uma vez que não contêm proteínas reguladoras, nem material genético. Estas vacinas podem ser administradas por via intramuscular, subcutânea, oral ou intranasal. São muito imunogénicas, sendo capazes de induzir imunidade humoral e celular, principalmente devido às suas propriedades morfológicas.

Este trabalho tem como principal foco de estudo a avaliação da indução da imunidade humoral em murganhos imunizados com TrV-VLPs que contêm uma sequência antigénica de *Trypanosoma cruzi*. Especificamente, pretende-se com este estudo a obtenção dos seguintes objetivos:

1. Caracterizar a propriedade imunoestimuladora de TrV-VLPs em modelo murino;
2. Otimizar o processo de imunização de murganhos vacinados VLPs contendo sequência antigénica de *T. cruzi*;
3. Caracterizar a resposta imune humoral nos murganhos imunizados com TrV-VLPs conjugados com os peptídeos derivados do HSP70, SATA-TLQPVERVL e SATA-TLQPVERVL-D-ala.

3. Materiais e Métodos

3. Materiais e métodos

3.1 Animais

Os animais utilizados neste estudo foram obtidos e mantidos no Biotério do Instituto de Higiene e Medicina Tropical. Usaram-se murganhos (*Mus musculus*) das linhagens CD-1, machos e fêmeas entre 5-8 semanas de idade. Os procedimentos de imunização e obtenção de amostras de soros foram realizados de acordo com as indicações da Direção Geral de Veterinária de Portugal.

3.2. Amostras de soros humanos de pacientes com doença de Chagas

Amostras de soro de indivíduos com diagnóstico para a doença de Chagas foram gentilmente cedidas pela Dra. Eva Dopico da Universidade de Barcelona e obtidos de acordo com o Comité de Ética. Os soros foram utilizados para a determinação de anticorpos anti-peptídeo.

3.3. Estirpes de *Trypanosoma cruzi*

Foi utilizada a estirpe Y de *T. cruzi* (Y) tripomastigotas, isoladas pela primeira vez de um caso humano por Silva e Nussenzweig em 1953 (Menezes, 1968). A estirpe Y (TcII) é caracterizada pela sua alta patogenicidade e baixa parasitemia durante a infeção murina. Para além disso, devido à sua capacidade infetiva e multiplicativa durante as fases agudas da doença, estas podem ser úteis no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (Pena *et al.*, 2011; Martinez-Diaz *et al.*, 2001). Tal como a estirpe Y (TcII), foi igualmente testada a estirpe Bolívia (TcI) e estirpe QMM5 (TcIII). Estas são igualmente importantes devido à ocorrência destas no ciclo silvestre e doméstico

durante a infecção por *T. cruzi*. Estas estirpes foram gentilmente cedidas pela Doutora Aline Rimoldi da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) - Brasil.

3.4 Isolamento e purificação de *Triatoma virus*

A técnica de extração de TrV baseia-se na extração do vírus por gradiente de sacarose a 5-30%. Todos os procedimentos referentes tanto à extração, isolamento e purificação de TrV foram realizados a partir de amostras de fezes de triatomíneos infetados com o *Triatoma virus* segundo o método descrito/realizado por Querido J., Agirre J., *et al* 2013., Diego M.A. Guérin, Aline Rimoldi e os restantes elementos (2015). As fezes secas foram obtidas dos insetos infetados e colhidas em papel de filtro Whatman. A seguir foi adicionado um tampão composto por 10 mM NaCl, 1 mM MgCl₂ e 200 mM ácido cítrico, pH 6. Posteriormente adicionou-se PMSF descongelado a -20°C. Toda a mistura foi homogeneizada e submetida a ultrassons durante 20 minutos. Após a centrifugação o sedimento formado foi ressuspensionado em tampão NMT e carregado no gradiente de sacarose a 5%-30%. De seguida mediu-se a densidade ótica a 260nm e 280 nm de cada alíquota para proceder ao SDS-PAGE a 12,5% onde será verificada a pureza das amostras.

Para além disso, o laboratório do Doutor Diego Guérin (Instituto Biofísica - CSIC-UPV/EHU-Espanhã) foi o local central da produção de TrV-VLPs e dos protótipos das vacinas TrV-VLPs-SATA-TLQPVERVL e TrV-VLPs-SATA-TLQPVERVL-*D-ala*.

3.4 Produção do peptídeo HSP70

Os peptídeos sintéticos *SATA-TLQPVERVL* e *SATA-TLQPVERVL-D-ala* foram sintetizados comercialmente pela empresa *Biomatix* (EUA). Posteriormente, foram conjugados à cápside de TrV-VLPs individualmente. Os protótipos de vacinas constituídos de TrV-VLPs-SATA-TLQPVERVL e TrV-VLPs-SATA-TLQPVERVL-*D-ala* formaram as vacinas quiméricas para a realização do presente estudo.

3.5 Conjugação dos peptídeos de *Trypanosoma cruzi* às partículas de *Triatoma vírus*

Para realizar a síntese do protótipo da vacina quimérica, utilizaram-se técnicas de conjugação química dos epítopos à superfície da cápside viral através de ligações covalentes. Deste modo, a conjugação ocorre entre os peptídeos conhecidos que provêm da proteína de choque térmico de *T. cruzi* denominada de *Heat-shock Protein* (HSP70) e a superfície de TrV-VLPs.

Inicialmente preparou-se uma plataforma estável para a ligação dos epítopos. Usou-se o grupo NH₂ das lisinas expostas da superfície da cápside vazia. Os ligantes são escolhidos conforme as suas características, neste caso foi o ligante com propriedades heterobifuncinais (Sulfo-SMCC, Thermo 22322) que têm dois grupos reativos com diferentes moléculas residuais (NH₂-SH, NH₂-COOH) onde podem ser ligados os peptídeos de *T. cruzi* (Figura 20).

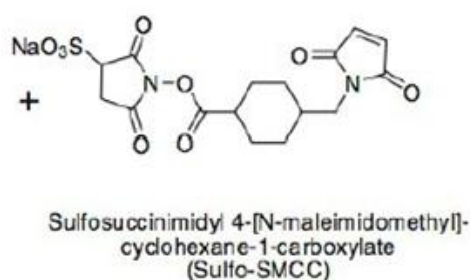


Figura 20. Estrutura química do ligante heterobifuncional de Sulfo-SMCC. Extraído de Cantin *et al.*, 2011.

Para este trabalho foi escolhido um peptídeo contido na proteína HSP70 (TLQPVERVL) de *T. cruzi*. Após a conjugação resultou o peptídeo com a seguinte denominação: SATA-TLQPVERVL. As etapas de conjugação foram realizadas de acordo com o protocolo desenvolvido por Cantin *et al.*, 2011 como se indica na figura 21.

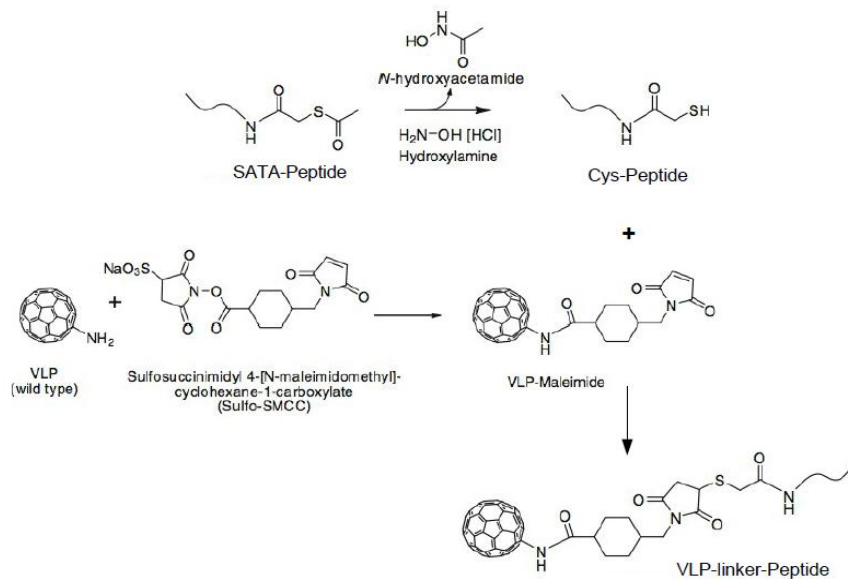


Figura 21. Síntese de conjugação do peptídeo com TrV-VLPs via NH_2-SH . Esquema extraído de Cantin *et al.*, 2011

3.6 Produção de soro policlonal anti-TrV-VLPs e anti-peptídeos

A preparação do antígeno inclui a sua purificação e quantificação. Neste estudo foram utilizados cinco antígenos para produzir os respetivos soros policlonais nos murganhos: 1) TrV-VLPs; 2) TrV-VLP-SATA-TLQPVERVL; 3) TrV-VLP-SATA-TLQPVERVL-*D-ala*, e os peptídeos isolados 4) SATA-TLQPVERVL e 5) SATA-TLQPVERVL-*D-ala*. Para o processo inicial de imunização de murganhos, utilizou-se o adjuvante completo de Freund - ACF (*Freund's Adjuvant, Complete*; Sigma/EUA) e o adjuvante incompleto de Freund - AIF (*Freund's Adjuvant, Incomplete*; Sigma/EUA) para seguintes imunizações.

Durante a primeira parte do estudo utilizaram-se 3 grupos de animais de 3 murganhos (*Mus musculus* CD1 machos com 8 semanas de idade obtidas no IHMT). Realizaram-se 3 imunizações com intervalo de 30 dias. Todos os animais receberam a injeção por via subcutânea (SC) até num volume máximo de 100 μ l (50 ng de antígeno) como representado na Tabela 3.

Grupos	Imunização	Administração (SC)	Adjuvantes
Grupo 1	50 ng TrV-VLPs	100 µl	ACF
Grupo 2	50 ng TrV-VLPs -SATA-TLQPVERVL conjugado	100 µl	ACF
Grupo 3	50 ng SATA-TLQPVERVL	100 µl	ACF

Tabela 3. Protocolo de imunização dos murganhos com TrV-VLPs, TrV-VLPs-SATA-TLQPVERVL conjugado e SATA-TLQPVERVL isolado

Após trinta, sessenta e noventa dias ocorridos após a primeira dose de imunização fez-se a colheita de amostras de soro dos animais imunizados. Posteriormente, as amostras foram incubadas a 4°C sem anticoagulante durante 30 minutos e centrifugadas a 10 000 g 10 minutos. É importante passar pelo processo de incubação para impedir a degradação dos elementos sanguíneos. Assim que se obtêm os soros, segue-se para o armazenamento a -20°C para futura análise da reatividade através do método de ELISA. Paralelamente um novo esquema de imunização foi estabelecido. Na tabela 4 é possível observar o esquema da imunização desta última estratégia. Utilizaram-se 3 murganhos por cada grupo (*Mus musculus* CD1 fêmeas com 8 semanas de idade obtidas no IHMT). Após trinta dias os animais foram sacrificados para obter as amostras de soros e a sua posterior análise.

Grupos	Imunização	Administração (SC)	Adjuvantes
G1	50 ng TrV-VLPs	100 µl	ACF
G2	50 ng TrV-VLPs-SATA-TLQPVERVL-D-ala conjugado	100 µl	ACF
G3	50 ng SATA-TLQPVERVL-D-ala	100 µl	ACF
G4	50 ng TrV-VLPs + 1 ng SATA-TLQPVERVL-D-ala não conjugado	100 µl	ACF

Tabela 4. Protocolo de imunização dos murganhos com novo peptídeo contendo terminal *D-ala*. Animais imunizados com TrV-VLPs, TrV-VLP-SATA-TLQPVERVL-D-ala (peptídeo conjugado), SATA-TLQPVERVL-D-ala (peptídeo isolado), e TrV-VLP com peptídeo SATA-TLQPVERVL-D-ala (não conjugado)

3.7 Ensaio imunoenzimático (ELISA) para a pesquisa de anticorpos anti-TrV-VLPs e anti-peptídeos

Inicialmente, realizou-se a adsorção de 50 ng de antígeno TrV-VLP, VLP-SATA-TLQPVERVL conjugado, SATA-TLQPVERVL ou 100 ng de extrato de *T. cruzi* à placa de 96 poços (*Nunc-Immuno MicroWell*, EUA). Cada poço foi incubado com 100 µl de respetivo antígeno dissolvido em tampão bicarbonato 0,1 M pH 8,5 overnight a uma temperatura de 4°C. A seguir, a placa foi lavada 3 vezes com 200 µl de tampão de lavagem (consiste na mistura de Tween20 0,05% com PBS (do inglês *Phosphate-Buffered Saline* - leite Molico®, Nestlé – Portugal) 1% m/v removendo os antígenos que estão em excesso, tendo em atenção a formação de bolhas de ar na placa, que devem ser removidas. Posteriormente, preparou-se o tampão de bloqueio (mistura de leite em pó a 1% com tampão de lavagem) que serve para reduzir as ligações inespecíficas. Todos os poços foram incubados com 200 µl deste tampão durante uma hora à temperatura ambiente com agitação (incubação válida para os restantes passos, com exceção do último). Após o período de incubação, a placa foi novamente lavada 3 vezes com 200 µl de tampão de lavagem. De seguida as placas foram incubadas com 100 µl/poço de solução de anticorpo primário em diluições seriadas em tampão

anticorpo (1:50, 1:100, 1:200, 1:400), tendo como finalidade a ligação do anticorpo presente no soro aos antígenos da placa. Após uma hora de incubação, o passo seguinte tem como objetivo remover todo o anticorpo que não ficou ligado ao antígeno, por isso a placa foi lavada 5 vezes com 200 µl de tampão de lavagem. Para detetar os anticorpos primários anti-TrV-VLPs, anti-TrV-VLPs-peptideo, anti-peptideo e anti-*T. cruzi* a placa foi incubada com 100 µl de solução de anticorpo secundário conjugado com HRP (do inglês *Horseradish Peroxidase*) (1:4000; Sigma-Aldrich USA). Para além de IgG total foram também analisados os níveis de subclasses de IgG, nomeadamente, IgG1 (50 ng anti-mouse IgG1:HRP; Abd Serotec UK) e IgG2a (25 ng anti-mouse IgG2a:HRP; Abd Serotec UK). Passada uma hora de incubação à temperatura ambiente com agitação, efetuou-se a última lavagem de 5 vezes com 200 µl de tampão de lavagem. A seguir preparou-se a solução de substrato para poder revelar a presença do conjugado. Esta solução consiste em 10 ml de tampão de citrato com 10 mg da OPD (do inglês *o-phenylenediamine dihydrochloride*), ou 1 comprimido/placa, e 10 µl de peróxido de hidrogénio (H₂O₂ 30%v/v). HRP é uma enzima e tem como funcionalidade catalisar a reação da OPD na presença de peróxido de hidrogénio, produzindo uma alteração na cor. A placa foi incubada com 100 µl desta solução durante 30 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Finalmente, adicionou-se para cada poço da placa 50 µl de ácido sulfúrico 4N para parar a reação. Os resultados foram obtidos através da leitura da absorvância no espectrofotómetro com filtro de 490 nm.

4. Resultados e Discussão

4. Resultados e discussão

Neste trabalho de investigação, um dos principais objetivos foi avaliar a indução da imunidade humoral em murganhos imunizados com TrV-VLPs que contém uma sequência antigénica de *T. cruzi*. Durante o trabalho utilizaram-se grupos de animais que foram sujeitos à imunização. Posto o processo de imunização, fizeram-se colheitas e executaram-se ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA indireto) para avaliar a reatividade dos soros dos animais imunizados.

ELISA tem como finalidade gerar resultados mensuráveis através da formação do imunocomplexo antígeno-anticorpo. Este método foi desenvolvido em 1971 por um grupo sueco Engvall e Perlman e por dois cientistas holandeses, Van Weeman e Schuurse, e deu luz às futuras pesquisas e diagnóstico de inúmeras doenças.

Este complexo permite identificar o anticorpo ou o antígeno em estudo, por meio de anticorpos marcados com enzima que atua sobre um substrato gerando alteração de cor. A formação do complexo ocorre através das ligações não covalentes de hidrogénio, interações hidrofóbicas e forças de Van der Waals.

A quantidade de antígeno utilizado depende das propriedades inerentes do próprio antígeno. Por vezes, o antígeno é pouco imunogénico o que dificulta a produção da resposta imune. Por isso, são adicionados os adjuvantes imunológicos, que são substâncias capazes de potenciar a resposta imune e auxiliar o antígeno desencadear uma resposta elevada e duradoura. São adjuvantes à base de óleos com os seguintes mecanismos de ação: prolongar a presença do antígeno no local da injeção e promover o transporte mais eficaz dos mesmos. Podem conter na sua constituição *Mycobacterium tuberculosis* inativada é o caso do ACF.

Sendo um método semi-qualitativo optou-se por estabelecer um valor de 50 ng de cada um dos antígenos e 100 ng por poço do extrato de *T. cruzi* estirpe Y, sendo esta quantidade suficiente para diferenciar os soros negativos.

Como descrito anteriormente, sabe-se que as VLPs, ou partículas virais (*Virus-like particles*), são estruturas extremamente organizadas e constituídas por proteínas víricas e isentas de material genético. Uma das principais propriedades funcionais destas partículas é a fácil adesão e penetração celular. Por isso, estas têm sido alvo desde há muito tempo para a produção das vacinas, devido à sua alta imunogenicidade.

4.1 Caracterização da propriedade imunoestimulatória de TrV-VLPs em modelo murino

Com objetivo de avaliar a propriedade imunoestimulatória de TrV-VLPs, imunizou-se um grupo de murganhos CD1 com VLPs purificadas. Para se determinar a presença de anticorpos do tipo IgG anti-TrV-VLPs, executou-se o teste ELISA indireto em soros de *Mus Musculus* de 3 grupos e determinou-se a absorvância resultante a um comprimento de onda de 490nm. Os soros dos animais não imunizados (pré-ímmunes), foram utilizados como controlo negativo e soros policlonais dos murganhos infetados com *T. cruzi* foram utilizados como controlo positivo das reacções serológicas. As amostras foram colhidas 30, 60 e 90 dias após a imunização primária. Utilizou-se uma diluição de 1:200 na análise de todas as amostras de soros dos animais imunizados. No final da imunização, os soros dos grupos inoculados com TrV-VLPs (Grupo 1) e TrV-VLPs-SATA-TLQPVERVL (Grupo 2) apresentaram-se quase 6 vezes mais reativos do que o controlo negativo, o que demonstra a capacidade do processo de imunização em induzir anticorpos do tipo IgG na produção de anticorpos anti-TrV-VLPs (Figura 22). No entanto, os animais do grupo inoculado apenas com SATA-TLQPVERVL (Grupo 3) não demonstram reacção quando comparados com o grupo de controlo, ou seja, este peptídeo não tem capacidade de gerar a produção de anticorpos do tipo IgG anti-SATA-TLQPVERVL.

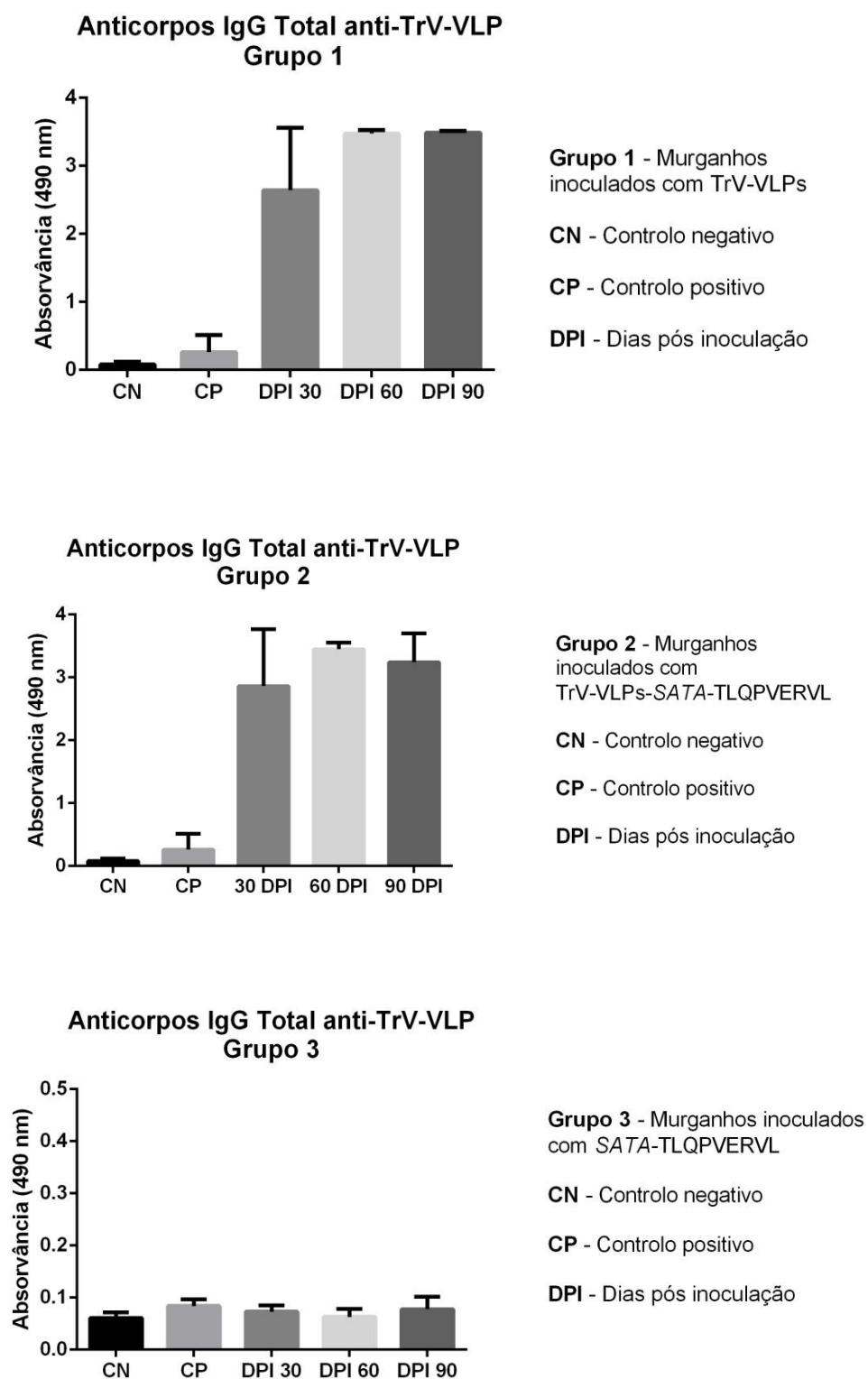
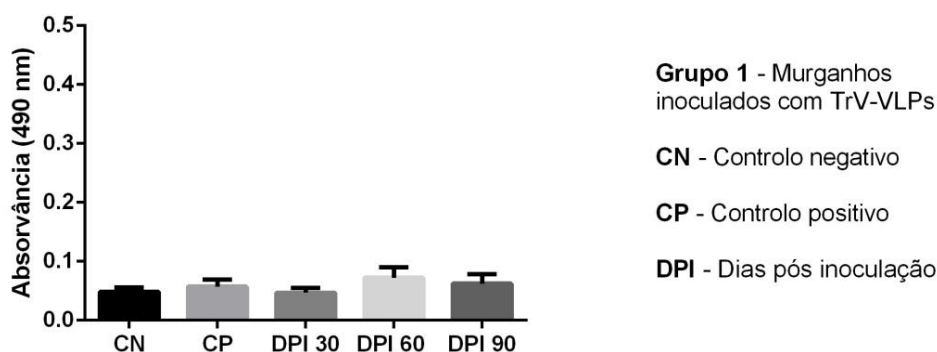


Figura 22. Determinação de anticorpos IgG Total anti-TrV-VLPs pelo método de ELISA indireto em soros de *Mus musculus* (CD1) de 3 grupos.

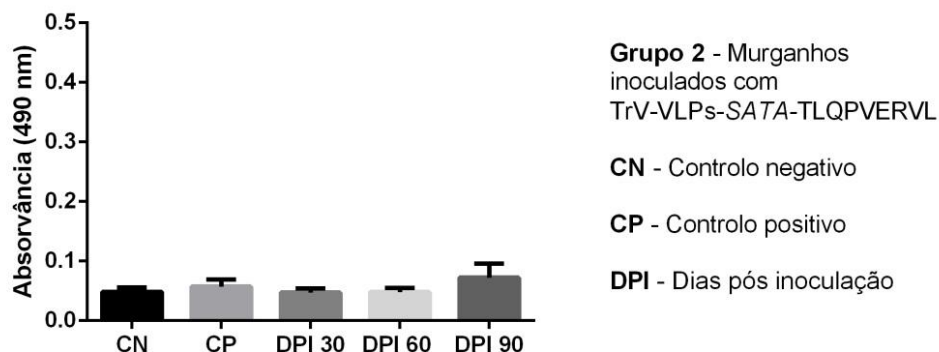
4.2 Caracterização da resposta imune humoral nos murganhos imunizados com *SATA-TLQPVERVL* isolado

Tendo em conta que TrV-VLPs apresentou uma capacidade imunogénica em induzir resposta de anticorpos em modelo murino, tentou-se demonstrar se o mesmo processo ocorre com o peptídeo de interesse. Imunizou-se outro grupo de animais (Grupo 3) apenas com o peptídeo (*SATA-TLQPVERVL*). Na figura 23 é possível observar que este grupo não gerou a produção de anticorpos do tipo IgG anti- *SATA-TLQPVERVL*, visto que os valores da absorvância estão muito semelhantes aos do controlo negativo. Tanto o grupo 3 como outros dois grupos não produziram anticorpos anti-peptídeo. Uma das razões desta incapacidade de resposta poderá estar relacionada com propriedades do próprio antígeno ser pouco imunogénico. Outra razão poderá estar relacionada com a baixa disponibilidade dos peptídeos durante o processo de imunização.

**Anticorpos IgG Total anti-*SATA-TLQPVERVL*
Grupo 1**



Anticorpos IgG Total anti-SATA-TLQPVERVL Grupo 2



Anticorpos IgG Total anti-SATA-TLQPVERVL Grupo 3

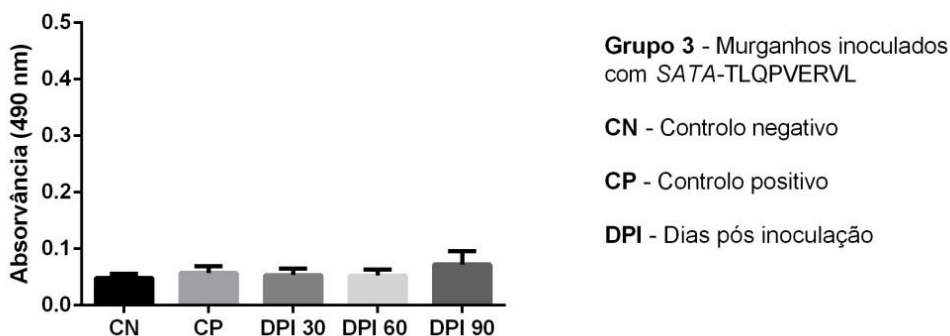


Figura 23. Determinação de anticorpos IgG Total anti-SATA-TLQPVERVL pelo método de ELISA indireto em soros de *Mus musculus* (CD1) machos de 3 grupos.

Os estudos realizados por Marañón e colaboradores (Marañón *et al.*, 2011) com modelos murinos, demonstram que alguns peptídeos presentes na proteína de choque (HSP70) de *T. cruzi* poderiam funcionar como importantes alvos antigénicos para a produção de vacinas contra *T. cruzi*, principalmente devido à capacidade desses epítomos em estimular células T CD8+ que por sua vez estimulam a atividade citotóxica. Este estudo sugeriu que os peptídeos têm capacidade de se ligar à molécula apresentadora da classe I HLA-A*02:01 que apresenta uma alta frequência na população das zonas endémicas para a DC. Estes autores também confirmaram que é uma proteína altamente imunogénica, em trabalhos realizados paralelamente com

doentes chagásicos a demonstrar elevada presença de anticorpos direcionados contra o antígeno

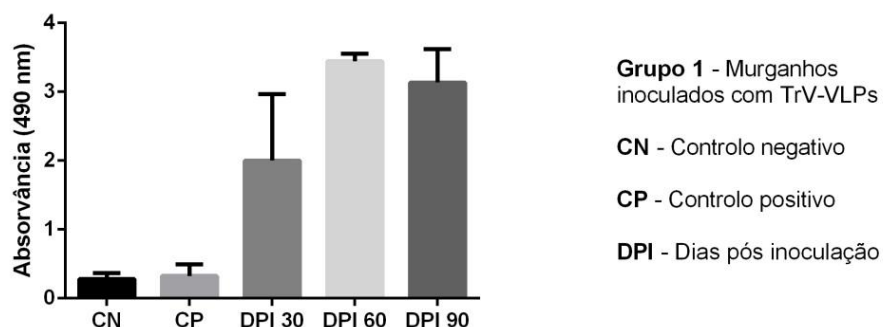
Apesar dos estudos apresentados por Marañon e colaboradores, no presente estudo não se pode confirmar a propriedade desses peptídeos em proteger murganhos imunizados com *SATA-TLQPVERVL*.

4.2.1 Caracterização da resposta imune humoral nos murganhos imunizados com TrV-VLP-*SATA-TLQPVERVL* conjugado

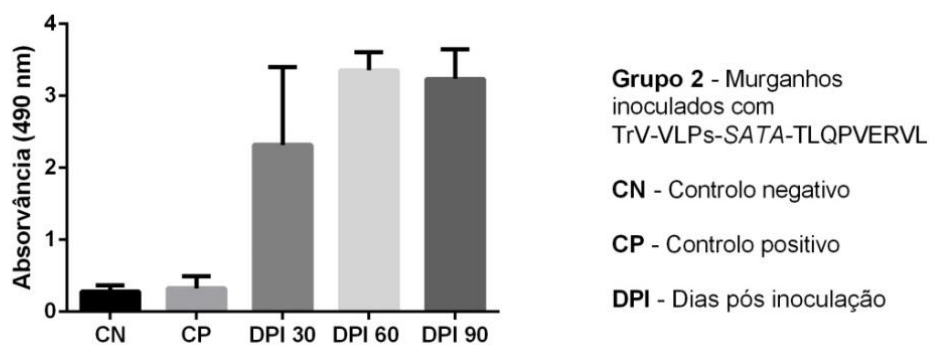
Para demonstrar que o peptídeo consegue ser mais imunogénico e produzir resposta humoral, os murganhos foram imunizados com uma conjugação do peptídeo com a TrV-VLPs. Curiosamente, os resultados obtidos foram muito positivos, visto que os veículos como VLPs são boas partículas para ajudar na penetração celular.

O grupo 2 da figura 24 mostra a resposta humoral dos murganhos imunizados com TrV-VLPs-*SATA-TLQPVERVL* tal como o grupo 1. Os animais imunizados produziram anticorpos totais IgG anti-TrV-VLPs-*SATA-TLQPVERVL* ao contrário do grupo 3 que apenas foi imunizado com peptídeo isolado. Estes dados demonstram que a conjugação do peptídeo às TrV-VLPs consegue estimular a resposta humoral do tipo IgG nos murganhos.

Anticorpos IgG Total anti-TrV-VLP-SATA-TLQPVERVL
Grupo 1



Anticorpos IgG Total anti-TrV-VLP-SATA-TLQPVERVL
Grupo 2



Anticorpos IgG Total anti-TrV-VLP-SATA-TLQPVERVL
Grupo 3

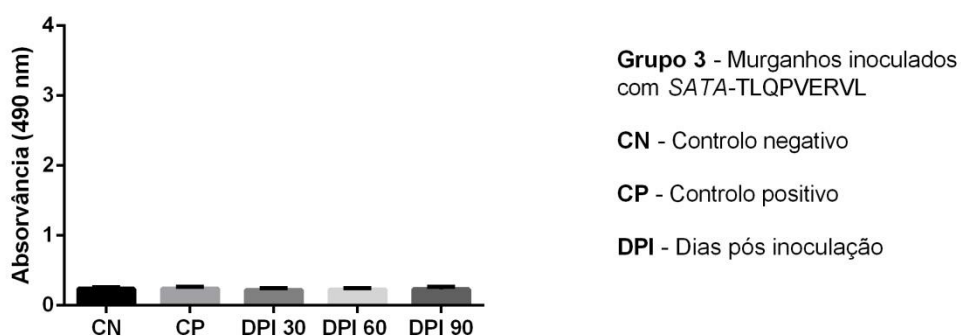


Figura 24. Determinação de anticorpos IgG Total anti-VLP-SATA-TLQPVERVL pelo método de ELISA indireto em soros de *Mus musculus* (CD1) de 3 grupos.

4.3 Otimização do processo de imunização de murganinhos vacinados com TrV-VLPs contendo sequência antigénica de *T. cruzi*

Durante a experiência foi necessário otimizar alguns pontos, nomeadamente as estirpes que são mais indicadas na experiência e as formas parasitárias que se adequam melhor quando são testadas com o peptídeo candidato para a vacina.

Na análise dos animais infetados com diferentes estirpes de *T. cruzi* na figura 25: TcIII (QMM5), TcI (Bolívia) e TcII (Y), comparativamente ao controlo negativo e os anticorpos produzidos pelos animais frente aos antígenos expostos das estirpes, concluiu-se que nenhum anticorpo reconhece o peptídeo em estudo (SATA-TLQPVERVL), tendo os valores semelhantes entre as diferentes estirpes, quando comparados com o controlo negativo (animais pré-ímmes).

Estas estirpes têm um grande peso neste trabalho devido à sua relação com o ser humano, sendo responsáveis pela infeção e desenvolvimento da doença de Chagas.

Durante todo o estudo das vacinas para *T. cruzi* foram utilizados extratos do parasita em forma tripomastigota. Estas formas apresentam um papel fundamental durante a infeção.

Como foi descrito anteriormente, ciclo de vida o parasita passa por várias fases de desenvolvimento. Todo o processo acontece quando o triatomíneo alimenta-se de sangue de um determinado mamífero infetado. Ao alimentar-se ingere formas tripomastigotas sanguíneas. Estas formas diferenciam-se na porção anterior do estômago do inseto e transformam-se em epimastigotas. Ao longo do percurso pelo intestino, as formas vão alcançando o intestino onde se vão diferenciando em tripomastigotas metacíclicos. Após terem atingido à cutícula do epitélio do reto, podem ser lançados para a urina ou fezes do inseto. Desta forma, quando o inseto pica o vertebrado, defecando ao mesmo tempo, passa as formas tripomastigotas metacíclicos para a corrente sanguínea do hospedeiro. Após estarem na corrente sanguínea passam por diferenciações até atingirem novas formas para infetar o inseto enquanto se alimenta e outras formas que afetam diferentes órgãos do hospedeiro.

Anticorpos IgG Total anti-SATA-TLQPVERVL

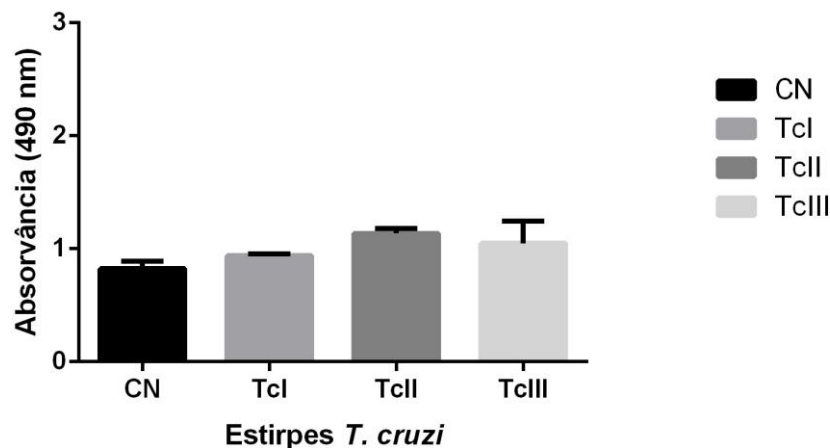


Figura 25. Determinação de anticorpos IgG Total anti-SATA-TLQPVERVL pelo método de ELISA indireto em soros de murganinhos infectados com *T. cruzi*. As amostras foram colhidas 55 dias após a inoculação com as estirpes TcI (Bolívia), TcII (Y), TcIII (QMM5). Utilizou-se uma diluição de 1:50 na análise de todas as amostras e controlo negativo (CN-animais pré-imunes)

4.4 Caracterização da resposta imune humoral em soros humanos frente ao peptídeo SATA-TLQPVERVL

Como já foi mencionado anteriormente, o principal objetivo deste estudo é encontrar um futuro candidato para vacina do *T. cruzi*. Na base dos resultados obtidos das imunizações e teste de imunoabsorção fez-se o desafio final com os soros dos pacientes com DC. Para isso foram selecionados alguns soros humanos mais imunogénicos, ou seja, com maior título de IgG Total.

Na figura 26 podemos observar que os soros dos doentes com Chagas não apresentam reatividade anti-SATA-TLQPVERVL, sendo os valores de absorvância dos soros negativos (sem a doença de Chagas) semelhantes ao dos soros positivos, ou seja, que apresentam a DC. Estes resultados podem evidenciar que o candidato antigénico não é reconhecido pelos anticorpos produzidos nos doentes que tiveram contacto com o parasita.

Na consequência dos resultados obtidos durante a primeira parte da experiência onde testámos o peptídeo (SATA-TLQPVERVL) optou-se por mudar a estratégia do estudo,

visto que o mesmo não apresentava os resultados garantindo a possibilidade da produção de uma nova vacina.

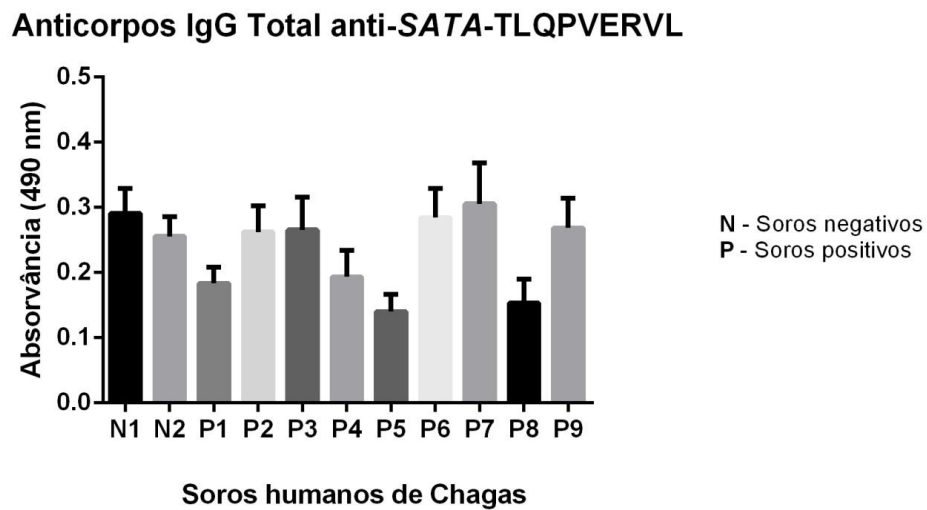


Figura 26. Determinação de anticorpos IgG Total anti-SATA-TLQPVERVL pelo método de ELISA indireto em soros humanos com *T. cruzi*. Utilizou-se uma diluição de 1:50 na análise de todas as amostras.

4.5 Caracterização da resposta imune humoral nos murganhos imunizados com TrV-VLP-SATA-TLQPVERVL-*D-ala*

O objetivo desta estratégia consistiu na modificação da produção do candidato alterando apenas a terminação, ou seja, protegendo o peptídeo com estereoisomero de L-Alanina (*D-ala*). Esta alteração vai conferir a proteção contra as possíveis agressões externas que poderiam ter resultado em degradação (Tugyi et al., 2004).

Tal como na primeira parte do trabalho, 4 grupos de 3 animais foram novamente imunizados com o novo candidato *SATA-TLQPVERVL-D-ala* e ao fim de 30 dias fez-se a colheita.

A análise dos resultados do ELISA da figura 27 indica que os animais do grupo 1, grupo 2 e grupo 4 imunizados com TrV-VLPs, TrV-VLP-*SATA-TLQPVERVL-D-ala* conjugado e TrV-VLP-*SATA-TLQPVERVL-D-ala* não conjugado produziram anticorpos totais IgG anti-TrV-VLPs e TrV-VLP-*SATA-TLQPVERVL-D-ala*. No

entanto, apenas o grupo 3, imunizado com SATA-TLQPVERVL-*D-ala* não produz anticorpos, chegando à mesma conclusão das análises das figuras anteriores.

A figura 27 demonstra mais uma vez a imunogenicidade da TrV-VLPs, comparativamente com os animais do grupo de controlo negativo (pré-ímmes).

Anticorpos IgG Total anti-TrV-VLP-SATA-TLQPVERVL-*D-ala*

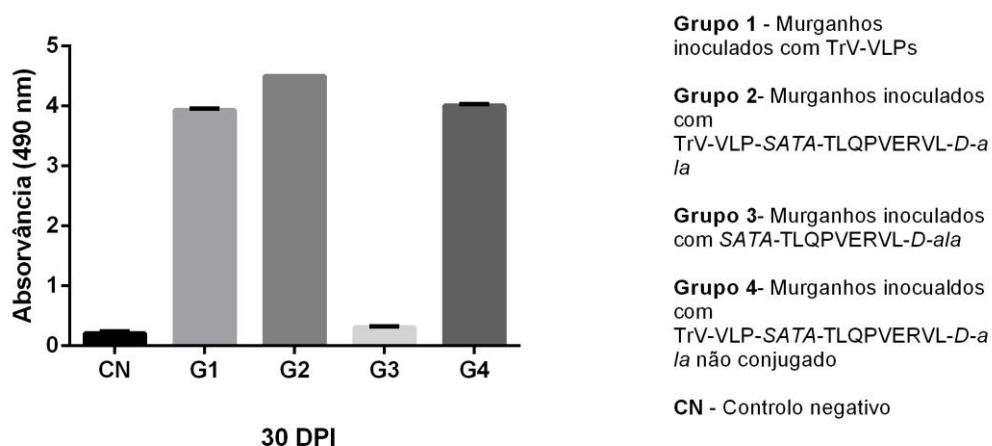


Figura 27. Determinação de anticorpos IgG Total anti-TrV-VLP-SATA-TLQPVERVL-*D-ala* pelo método de ELISA indireto em soros de *Mus musculus* (CD1) de 4 grupos. As amostras foram colhidas 30 dias após a inoculação. Os soros dos animais saudáveis, pré-ímmes foram utilizados como controlos negativos. Utilizou-se uma diluição de 1:100 na análise de todas as amostras.

A partir desta análise da figura anterior confirma-se também a correta produção e ligação do peptídeo à TrV-VLPs e a sua ótima capacidade transportadora de antígenos, concluindo de igual modo que o peptídeo administrado isoladamente não tem qualquer efeito sobre a resposta humoral dos murganhos, podendo estar relacionado com a própria biodisponibilidade.

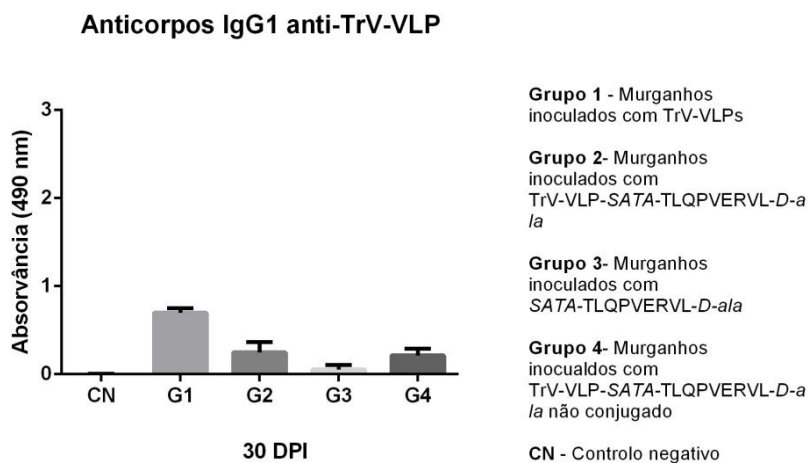
Para além da pesquisa de anticorpos IgG Total estudou-se a expressão de diferentes subclasses de IgG, nomeadamente, IgG1 e IgG2a.

Os anticorpos IgG2a são responsáveis pela fixação do complemento e citotoxicidade celular, para além das funções anteriores participa na resposta imune humoral a vírus.

A análise dos resultados do ELISA da figura 28B mostra uma resposta humoral evidente com a produção da IgG do tipo IgG2a contra as partículas virais nos

murganhos. Em relação ao grupo de interesse, o grupo 2 imunizado com TrV-VLP-SATA-TLQPERVL-*D-ala*, da mesma figura 28B são demonstrados os níveis de absorvância maiores relativamente ao grupo de controlo, o que confirma a sua imunogenicidade nos animais.

A



B

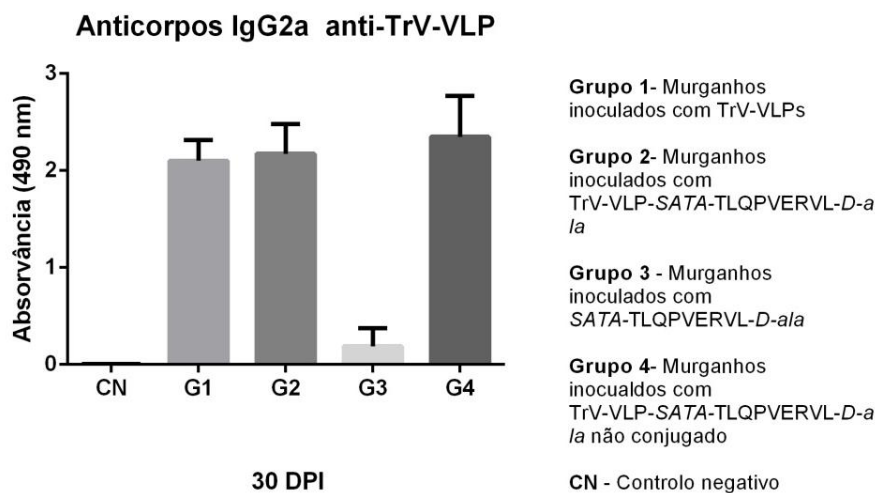
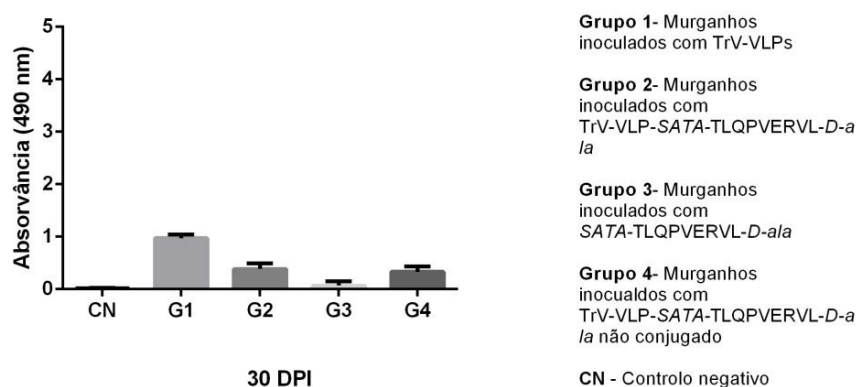


Figura 28. Análise comparativa entre a resposta (A) Th1 e (B) Th2. Determinação de anticorpos IgG2a e IgG1 anti-TrV-VLP pelo método de ELISA indireto em soros de *Mus musculus* (CD1) de 4 grupos.

Vários estudos apontam que durante a infecção viral nos murganhos, a resposta do sistema imune é maioritariamente do tipo Th1. Sendo por isso os níveis dos anticorpos de IgG da subclasse IgG2a (Figura 28B) superiores ao nível dos anticorpos da subclasse IgG1 (Figura 29A). Nos gráficos da figura 28 B e 29 B consegue-se observar um alto nível de produção de anticorpos da classe IgG2a comparativamente aos anticorpos da classe IgG1 nas mesmas figuras. Tanto a produção dos anticorpos do tipo IgG2a e IgG1 apresenta as proporções de absorvância semelhantes nos grupos dos animais imunizados com TrV-VLP-SATA-TLQPVERVL-*D-ala* e o nos animais imunizados apenas com TrV-VLP.

A

Anticorpos IgG1 anti-TrV-VLP-SATA-TLQPVERVL-*D-ala*



B

Anticorpos IgG2a anti-TrV-VLP-SATA-TLQPVERVL-*D-ala*

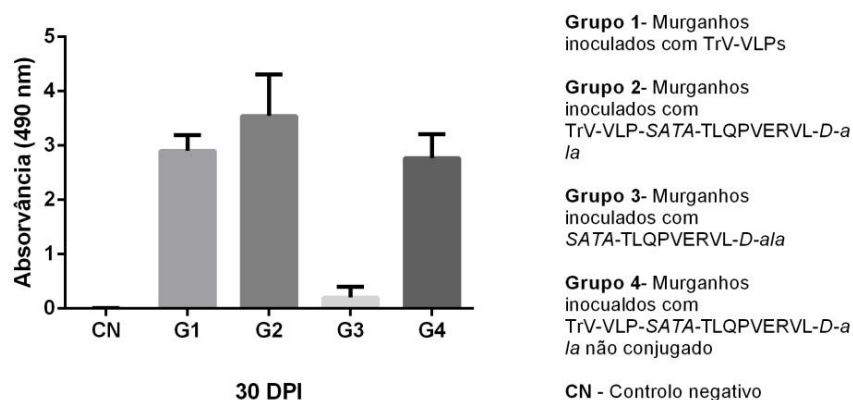


Figura 29. Análise comparativa entre a resposta (A) Th1 e (B) Th2. Determinação de anticorpos IgG2a e IgG1 anti-TrV-VLP-SATA-TLQPVERVL-*D-ala* pelo método de ELISA indireto em soros de *Mus musculus* (CD1) de 4 grupos.

Em relação a reatividade dos soros dos animais frente ao antígeno *T. cruzi* observa-se que os soros são pouco reativos. Os candidatos não possuem capacidade imunológica para estimular anticorpos que reconhecessem o parasita (Figura 30).

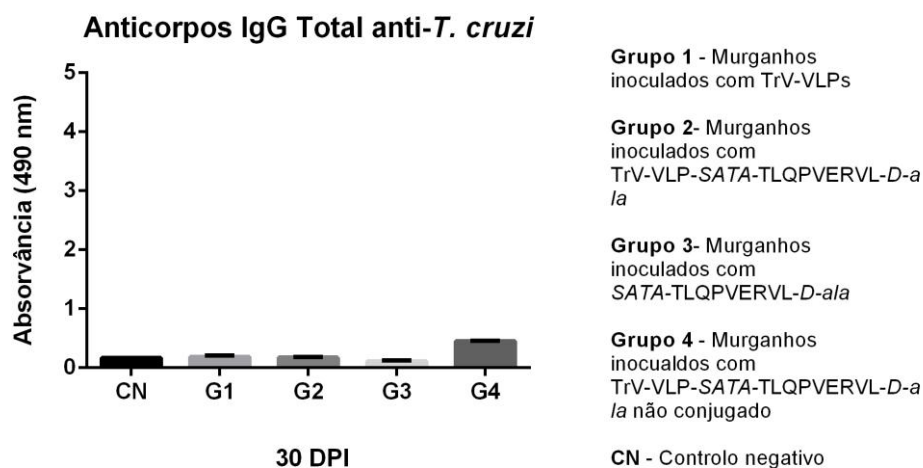


Figura 30. Determinação de anticorpos IgG Total anti-*T. cruzi* pelo método de ELISA indireto em soros de *Mus musculus* (CD1) de 4 grupos. As amostras foram colhidas 30 dias após a inoculação. Os soros dos animais saudáveis, pré-imune foram utilizados como controlos negativos. Utilizou-se uma diluição de 1:100 na análise de todas as amostras.

4.6 Caracterização da resposta imune humoral em soros humanos frente ao peptídeo SATA-TLQPVERVL-D-ala

Por último, repetiu-se o desafio final com os soros dos doentes com Chagas mais reativos da Barcelona para perceber se os mesmos reconhecem ou não o novo peptídeo. Na base da observação, os resultados apresentam valores semelhantes comparativamente à análise anterior, ou seja, o peptídeo não é reconhecido pelos soros humanos chagásicos (Figura 31).

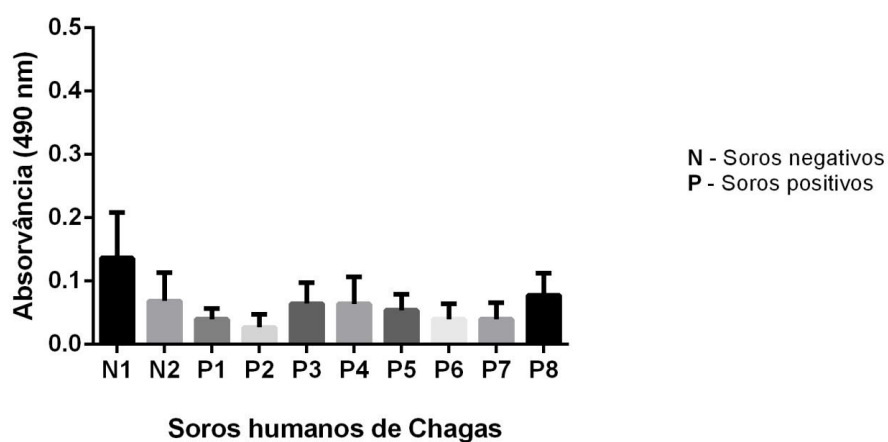
Anticorpos IgG Total anti-SATA-TLQPVERVL-D-ala

Figura 31. Determinação de anticorpos IgG Total anti-SATA-TLQPVERVL-D-ala pelo método de ELISA indireto em soros humanos com *T. cruzi*. Utilizou-se uma diluição de 1:50 na análise de todas as amostras.

5. Conclusão

5.Conclusão

Este trabalho teve como principal objetivo estudar a avaliação da indução da imunidade humoral em murganhos imunizados com TrV-VLPs que contêm uma sequência antigénica de *Trypanosoma cruzi* para o desenvolvimento de uma futura vacina contra a doença de Chagas. Todos os resultados foram discutidos ao longo do trabalho, com os seguintes objetivos:

1. Caracterizar a propriedade imunoestimuladora de TrV-VLPs em modelo murino: Ao longo de toda a investigação, foi possível confirmar o potencial imunogénico das TrV-VLPs, devido às suas características únicas de apresentarem altos níveis de estruturas repetitivas na sua superfície viral e alta habilidade de induzir imunidade inata para dar sequência à resposta imune. Estas, por sua vez, conseguiram induzir resposta imune humoral nos murganhos com produção de anticorpos do tipo IgG e das suas subclasses IgG1 e IgG2a.
2. Otimizar o processo de imunização de murganhos vacinados com TrV-VLPs contendo sequência antigénica de *T. cruzi*: Todo o processo de determinação da produção da resposta humoral nos murganhos foi inicialmente otimizado através de diferentes tentativas de imunização nos murganhos ao longo do tempo. Foi possível determinar a dose de administração da TrV-VLPs com candidatos antigénicos, que por sua vez permitiu a deteção de anticorpos produzidos através de técnicas de ELISA.
3. Caracterizar a resposta imune humoral nos murganhos imunizados com TrV-VLPs conjugados com os peptídeos SATA-TLQPVERVL e SATA-TLQPVERVL-*D-ala*: Por último, foi possível avaliar a resposta imune humoral nos murganhos imunizados, nomeadamente a confirmação da produção de anticorpos IgG e as suas respetivas subclasses (IgG1 e IgG2a) anti-TrV-VLPs, das vacinas (com peptideo conjugado) TrV-VLPs-SATA-TLQPVERVL e TrV-VLPs-SATA-TLQPVERVL-*D-ala*, SATA-TLQPVERVL isolado e a mistura do TrV-VLPs com os peptideos SATA-TLQPVERVL e SATA-TLQPVERVL-*D-ala*

(não conjugados) e anti-*T. cruzi*. Para além dos objetivos alcançados, é de grande interesse salientar o estudo realizado dos candidatos antigénicos em soros humanos chagásicos e nos animais infetados com diferentes estirpes de *T. cruzi*, nomeadamente, com estirpe TcII (Y), TcIII (QMM5) e TcI (Bolívia). Os anticorpos produzidos por diferentes estirpes não reconhecem o candidato antigénico.

6. Referências

6. Referências

1. Agirre, J. et al., Goret, G., Le Goff, M., Sánchez-Eugenía, R., Marti, G.A., Navaza, J., Guérin, D.M., Neumann, E., 2013. Cryo-electron microscopy reconstructions of triatoma virus particles: a clue to unravel genome delivery and capsid disassembly. *Journal of General Virology*, 94:1058-68.
2. Agirre, J., Aloria, K., Arizmendi, J. M., Iloro, I., Elortza, F., Sánchez-Eugenía, R., Marti, G.A., Neumann, E., Rey, F.A., Guérin D.M.A., 2011. Capsid protein identification and analysis of mature *Triatoma virus* (TrV) virions and naturally occurring empty particles. *Virology*, 409(1): 91-101.
3. Almeida, B.R., Santilano, F. C. Levantamento dos métodos de diagnóstico para a doença de Chagas. Editora Biosfera. Brasil. 2012.
4. Álvarez, J.M., Fonseca, R., Silva, H., Marinho, C. R. F., Bortoluci, K.R., Sardinha, L.R., Epiphanyo, S., Lima, M.R. D., 2014. Chagas Disease: Still Many Unsolved Issues. *Mediators of Inflammation*, 9.
5. Andrade D. V., Gollob K.J., Dutra W.O., 2014. Acute Chagas Disease: New Global Challenges for an Old Neglected Disease. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 1-10
6. Araújo-Jorge T.C., Castro S.L. Conceitos atuais em doença de Chagas humana e experimental. Resposta do hospedeiro à infecção. Scielo Books. Editora Fiocruz. Rio de Janeiro. 2000.
7. Arce-Fonseca, M., Ballinas-Verdugo, M. A., Zenteno, E. R. A., Suárez-Flores, D., Carrillo-Sánchez S. C., Alejandre-Aguilar R., Rodríguez-Morales O., 2013. Specific humoral and cellular immunity induced by *Trypanosoma cruzi* DNA immunization in a canine model. *Veterinary Research, BioMed Central*, 44(1), 15.
8. Arce-Fonseca, M., Rios-Castro M., Carrillo-Sánchez Sdel C., Martínez-Cruz M., Rodríguez-Morales O., 2015. Prophylactic and therapeutic DNA vaccines against Chagas disease. *Parasites & Vectors*, 8:121.
9. Bahia, M.T., Diniz, L.F., Mosqueira, V.C.F., 2014. Therapeutical approaches under investigation for treatment of Chagas disease. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 23(9):1-13.

10. Barrias, E.S., Carvalho, T. M.U., Souza W., 2013. *Trypanosoma cruzi*: entry into mammalian host cells and parasitophorous vacuole formation. *Frontiers in Immunology*, Vol 4:Article 186.
11. Beaumier C.M., Gillespiea, P.M., Strycha, U., Haywardd, T., Hotez, J., Bottazzi, M.E., 2016. Status of vaccine research and development of vaccines for Chagas disease. *Vaccine*, 2996–3000.
12. Bern, C., 2015. Chagas' Disease. Review Article. *The new England Journal of Medicine*, 373:5.
13. Blum, J.A., Zellweger, M.J., Burri, C., Hatz, C., 2008. Cardiac involvement in African and American trypanosomiasis. *The Lancet Infectious Diseases*, 8(10):631-41.
14. Boscardin, S. B., Torrecilhas, A. C. T., Manarin, R., Revelli, S., Rey, E. G., Tonelli, R. R., Silber, A. M., 2010. Chagas' disease: an update on immune mechanisms and therapeutic strategies. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14(6b): 1373–1384.
15. Brenière, S.F., Waleckx, E., Barnabé, C., 2016. Over Six Thousand *Trypanosoma cruzi* Strains Classified into Discrete Typing Units (DTUs): Attempt at an Inventory. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 10(8): e0004792.
16. Bryan, M. A., Guyach, S. E., Norris, K. A., 2010. Specific Humoral Immunity versus Polyclonal B Cell Activation in *Trypanosoma cruzi* Infection of Susceptible and Resistant Mice. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(7), e733.
17. Burgos, J.M., Risso, M.G., Brenière, S.F., Barnabé, C., Campetella, O., 2013. Differential Distribution of Genes Encoding the Virulence Factor Trans-Sialidase along *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units. *PLOS ONE*, 8(3): e58967.
18. Bustamante Gomez, M., Gonçalves Diotaiuti, L., Gorla, D. E. 2016. Distribution of Pyrethroid Resistant Populations of *Triatoma infestans* in the Southern Cone of South America. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(3), e0004561.
19. Bustamante, J., and Tarleton, R., 2015. Reaching for the Holy Grail: insights from infection/cure models the prospects for vaccines for *Trypanosoma cruzi* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Vol. 110(3): 445-451.
20. Cantin, G.T., Resnick, S., Jin, H. et al., 2011. Comparison of methods for chemical conjugation of an Influenza Peptide to wild-type and cysteine-mutant virus-like

- particles expressed in *Pseudomonas fluorescens*. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, Vol.17.
21. Cardoso, M.S., Reis-Cunha, J.L., Bartholomeu, D.C., 2016. Evasion of the Immune Response by *Trypanosoma cruzi* during Acute Infection. Frontiers in Immunology, Vol. 6:Article 659.
 22. Castelo-Branco, C., Soveral, I., 2013. The immune system and aging: A review. ISGE, 30(1).
 23. Castilho, J., Carnielli P. et al., 2010. A comparative study of rabies virus isolates from hematophagous bats in Brazil. Journal of Wildlife Diseases, 45 (4): pp: 1335-1339.
 24. Castro, S. V., Lobo, C. H., 2013. Proteínas de Choque Térmico Hsp70: Estrutura e atuação em resposta ao estresse celular. Acta Veterinaria Brasilica, 7(4).
 25. CDC. Parasites-American Trypanosomiasis. Disponível em: <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/index.html>. 2013
 26. Chirinos, S., Velarde, C. Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de la trypanosomiosis americana (enfermedad de Chagas). Edição 2ª. Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud. Lima. 2006.
 27. Chroboczek, J., Szurgot, I., Szolajska, E., 2014. Virus-like particles as vaccine. Expert Review of Vaccines, 61(3):531-9.
 28. Cominetti, M.C., Csordas, B.G., Cunha, R.C., Andreotti, R., 2014. Geographical distribution of *Trypanosoma cruzi* in triatomine vectors in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 47(6):747-55.
 29. Cortez J., Ramos, E., Valente, C., Seixas J., Vieira A., 2012. A Expressão Global da Doença de Chagas – Oportunidades Emergentes e Impacto em Portugal. Acta Médica Portuguesa, 25(5):332-339.
 30. Cosentino, R. O., Agüero, F., 2012. A Simple Strain Typing Assay for *Trypanosoma cruzi*: Discrimination of Major Evolutionary Lineages from a Single Amplification Product. PLOS Neglected Tropical Diseases, 6(7), e1777.
 31. Coura, J. R. 2015. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions – A comprehensive review. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Vol.110 (3):277-282

32. Crisci, E., Bárcena, J., Montoya, M.,2012. Virus-like particles: the new frontier of vaccines for animal viral infections. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 148(3-4):211-25.
33. Cruvinel, W.M., Júnior, D.M., Araújo, J. A. P., Catelan, T. T. T., Souza, A. W. S., Silva,N. P., Andrade ,L. E. C., 2010. Sistema Imunitário – Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória.*Revista Brasileira de Reumatologia*, 50(4):434-61.
34. Culley, A. I., Lang, A. S.,Suttle, C. A., 2007. The complete genomes of three viruses assembled from shotgun libraries of marine RNA virus communities. *Virology Journal*, 4, 69.
35. Czibener C., La Torre J.L., Muscio O.A., Ugalde R.A., Scodeller E.A.,2000. Nucleotide sequence analysis of *Triatoma virus* shows that it is a member of a novel group of insect RNA viruses. *Journal of general virology*.81: 1149-1154.
36. De Pablos, L. M., Osuna, A., 2012. Multigene Families in *Trypanosoma cruzi* and Their Role in Infectivity. *Infection and Immunity*, 80(7): 2258–2264.
37. Delves, P.J.,Roitt, I.M.,2000. The immune system. *Advances in Immunology*, Vol.343
38. Dos Santos Virgilio, F., Pontes, C., Dominguez, M. R., Ersching, J., Rodrigues, M. M., Vasconcelos, J. R., 2014. CD8+ T Cell-Mediated Immunity during *Trypanosoma cruzi* Infection: A Path for Vaccine Development? *Mediators of Inflammation*, 243786.
39. Dumonteil, E., 2007. DNA Vaccines against Protozoan Parasites: Advances and Challenges. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*.11.
40. Dumonteil, E., Bottazzi M., Zhan, B., Heffernan, M., Jones, K., Valenzuela, J., Kamhawi, S., Ortega, J., Rosales, L., Lee, B., Bacon, K.,Fleischer, B., Slingsby, B., Cravioto, M., Tapia-Conyer, R.,, Hotez, P. 2012. Accelerating the development of a therapeutic vaccine for human Chagas disease: rationale and prospects. *Expert Review of Vaccine*,Vol.11 (9).
41. Dumonteil, E., Escobedo-Ortegon, J., Reyes-Rodriguez, N., Arjona-Torres, A., Ramirez-Sierra, M. J., 2004. Immunotherapy of *Trypanosoma cruzi* Infection with DNA Vaccines in Mice. *Infection and Immunity*,72(1): 46–53.

42. Epting, C. L., Coatesa, B. M., Engmanb, D. M., 2010. Molecular Mechanisms of Host Cell Invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Experimental Parasitology*, 126(3):283–291.
43. Estrozi, L.F. ,Neumann, E. ,Squires, G. ,Rozas-Dennis, G. ,Costabel, M. ,Rey F.A. , Guérin, D.M.A., Navaza, J., 2008. Phasing of the Triatoma virus diffraction data using a cryo-electron microscopy reconstruction. *Virology*,375: 85-93
44. Fernandes, M. C., Andrews, N. W., 2012. Host Cell Invasion by *Trypanosoma cruzi*: A Unique Strategy that Promotes Persistence. *Fems Microbiology Reviews*, 36(3): 734–747.
45. Flechas, I. D., Cuellar, A., Cucunubá, Z.M., Rosas, F., Velasco, V., Steindel, M., Thomas, M.C., López, C.M., González, J., Mario., Puerta, J.C., 2009. Characterising the KMP-11 and HSP-70 recombinant antigens' humoral immune response profile in chagasic patients. *BMC Infectious Diseases*, 9:186.
46. Franco, C.F., Mellado, M.C., Alves, P.M., Coelho, A.V., 2010. Monitoring virus-like particle and viral protein production by intact cell MALDI-TOF mass spectrometry. *Talanta*, 80(4):1561-8.
47. Galvao, C., Justi, S., 2015. An overview on the ecology of Triatominae (Hemiptera:Reduviidae). *Acta Tropica*. 151: 116–125
48. Gourbière, S., Dorn, P., Tripet F., Dumonteil, E., 2011. Genetics and evolution of triatomines:from phylogeny to vector control. *Heredity*,1-13.
49. Guhl, F., 2013.Epidemiología molecular de *Trypanosoma cruzi*. *Revista Española de Salud Pública*, 1-8.
50. Hicks, D. J., Fooks, A. R., & Johnson, N., 2012. Developments in rabies vaccines. *Clinical and Experimental Immunology*, 169(3), 199–204.
51. Higuera, S. L., Guhl, F., Ramírez, J. D., 2013. Identification of *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units (DTUs) through the implementation of a High-Resolution Melting (HRM) genotyping assay. *Parasites & Vectors*, 6:112.
52. Jennings, G.T., Bachmann M.F., 2008. The coming of age of virus-like particle vaccines.*Biological Chemistry*,389:521–536.
53. Johnson, J.E., Chiu, W., 2000. Structures of virus and virus-like particles. *Current Opinion in Structural Biology*, (2):229-35.

54. Joshi, H., Lewis, K., Singharoy, A., Ortoleva, P.J., 2013. Epitope engineering and molecular metrics of immunogenicity: a computational approach to VLP-based vaccine design. *Vaccine*, 31(42):4841-7.
55. Junqueira, C, Caetano, B, Bartholomeu, D.C., Melo, M.B, Ropert C, Rodrigues, M.M., Gazzinelli R.T. ,2010. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. *Expert reviews in molecular medicine*, 12:e29.
56. Kalynych, S., Pálková, L., Plevka, P., 2016. The Structure of Human Parechovirus 1 Reveals an Association of the RNA Genome with the Capsid. *Journal of Virology*, 90(3): 1377–1386.
57. Kushnir, N., Streatfield, S.J., Yusibov, V., 2012. Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: diversity of targets and production systems and advances in clinical development. *Vaccine*, 31(1):58-83.
58. Lazzari, C.R. et al. *Advances in Insect Physiology: Physiology of Human and Animal Disease Vectors*, 1ªEd. Vol.37.2009.
59. Lewis, M. D., Ma, J., Yeo, M., Carrasco, H. J., Llewellyn, M. S., Miles, M. A., 2009. Genotyping of *Trypanosoma cruzi*: Systematic Selection of Assays Allowing Rapid and Accurate Discrimination of All Known Lineages. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 81(6), 1041–1049.
60. Lewis, M.D., Llewellyn1, M.S , Yeo, M., Acosta, N., Gaunt, M.W., Miles, M.A. 2011. Recent, Independent and Anthropogenic Origins of *Trypanosoma cruzi* Hybrids. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 5 (10): e1363.
61. Lima, L, Espinosa-Álvarez, O, Ortiz, P.A., Trejo-Varón, J.A., Carranza, J.C., Pinto C.M., Serrano, M.G., Buck, G.A., Camargo, E.P.,Teixeira,M,M., 2015.Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* in bats, and multilocus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting Tcbat as an independent DTU (discrete typing unit).Elsevier, 151:166-77.
62. Lima, Vdos S., Xavier, S.C., Maldonado, I.F., Roque, A.L., Vicente, A.C., Jansen, A.M., 2014. Expanding the Knowledge of the Geographic Distribution of *Trypanosoma cruzi* TcII and TcV/TcVI Genotypes in the Brazilian Amazon. *PLoS ONE*, 9(12): e116137.

63. Lua, L.H., Connors, N.K., Sainsbury, F., Chuan, Y.P., Wibowo, N., Middelberg, A.P.,2014. Bioengineering virus-like particles as vaccines. *Biotechnology and Bioengineering*, 111(3):425-40.
64. Luquetti, A., Moreira, E.F., Gadelha, M. F. S., Gomes, Y. M., Ribinik, M. L. R.,Martelete, M. A. Doença de Chagas – Triagem e diagnóstico sorológico em unidades hemoterápicas e laboratórios de saúde público. Brasília. 1998.
65. Ma, Y., Weiss, L., Huang, H., 2015. Strategy for the Development of Vaccines Against Chagas Disease. *Vaccines Journals*, 1: 001.
66. Malone, K., Hinman, A. Vaccination Mandates: The Public Health Imperative and Individual Rights. Chapter 13. *Law in Public Health Practice*. 2007
67. Manoel-Caetano, F.,S., Silva. A.Elizabete., 2007. Implications of genetic variability of *Trypanosoma cruzi* for the pathogenesis of Chagas disease. *Cadernos de Saúde Pública*, 23(10):2263-2274.
68. Marañón C., Thomas M.C., Guzman F., Patarroyo M.E., López M.C., 2011. Identification of HLA-A2.1 restricted CTLs epitopes in the T. cruzi HSP70 protein. *Ars Pharmaceutica*, 42:1;67-80.
69. Martinez-Diaz, R., Escario, J., Nogal-Ruiz, J., Gomez-Barrio, A. 2001. Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains.Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Vol.96, n.1, pp.53-59.
70. Martins, N. O., de Souza, R. T., Cordero, E. M., Maldonado, D. C., Cortez, C., Marini, M. M., da Silveira, J. F., 2015. Molecular Characterization of a Novel Family of *Trypanosoma cruzi* Surface Membrane Proteins (TcSMP) Involved in Mammalian Host Cell Invasion. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(11): e0004216.
71. Mehlhorn, H. *Progress in Parasitology*. Springer. Germany.2011
72. Menezes, H. 1968. Protective effect of an avirulent (cultivated) strain of *Trypanosoma cruzi* against experimental infection in mice, 10(1):1-4.
73. Montgomery, S. P., Starr, M. C., Cantey, P. T., Edwards, M. S., Meymandi, S. K., 2014. Neglected Parasitic Infections in the United States: Chagas Disease. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 90(5): 814–818.

74. Morais, C.G.V., Lima, A.K.C., Terra R., Santos, R.F., Da-Silva, S.A.G., Dutra, P.M.L., 2015. The Dialogue of the Host-Parasite Relationship: *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* Infection. *BioMed Research International*, 19.
75. Morell M., Thomas M.C., Caballero T., Alonso C., López M.C., 2006. The genetic immunization with paraflagellar rod protein-2 fused to the HSP70 confers protection against late *Trypanosoma cruzi* infection. *Vaccine*, 24(49-50):7046-55.
76. Morillo, C. A., Marin-Neto, J.A., Avezum, A., Sosa-Estani, S., Rassi, A., Rosas, F., Villena, E., Quiroz, R., Bonilla, R., Britto, C., Guhl, F., Velazquez, E., Bonilla, L., Meeks, B., Rao-Melacini, P., Pogue, J., Mattos, A., Lazdins, J., Connolly, S.J., Yusuf, S., 2015. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. *The new england journal of medicine*, 373:1295-1306.
77. Muscio, O.A., La Torre, J.L., Scodeller, E.A. 1988. Characterization of *Triatoma Virus*, a picorna-like virus isolated from the triatomine bug *Triatoma infestans*. *Journal of General Virology*, 69: 2929-2934.
78. Nagajyothi, F., Machado, F. S., Burleigh, B. A., Jelicks, L. A., Scherer, P. E., Mukherjee, S. Tanowitz, H. B., 2012. Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* persistence in Chagas disease. *Cellular Microbiology*. 14(5): 634–643.
79. Neves, D. P. *Parasitologia Humana*. 11 ed. São Paulo: Atheneu. 2004.
80. Normas técnicas de profilaxia da raiva humana. Ministério da Saúde. Departamento de vigilância epidemiológica. Brasil. 2011.
81. Ongus, J.R., Peters, D., Bonmatin, J.M., Bengsch, E., Vlak, J.M., van Oers, M.M., 2004. Complete sequence of a picorna-like virus of the genus Iflavirus replicating in the mite *Varroa destructor*. *Journal of General Virology*, 85 (12):3747-55.
82. Peeters, B.P.H. Recombinant and chimeric viruses: Evaluation of risks associated with changes in tropism. Wageningen University and Research Centre. Division of Infectious Diseases. Dinamarca. 2005
83. Pena, D.A., Eger, I., Nogueira, L., Heck, N., Menin, A., Báfica, A., Steindel, M. 2011. Selection of TcII *Trypanosoma cruzi* Population Following Macrophage Infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 204: 478-86.
84. Pereira, P., Navarro, E., 2013. Challenges and perspectives of Chagas disease: a review. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 19:34.

85. Planelles L., Thomas M. C., Alonso C., López M. C., 2001. DNA Immunization with *Trypanosoma cruzi* HSP70 Fused to the KMP11 Protein Elicits a Cytotoxic and Humoral Immune Response against the Antigen and Leads to Protection. *Infection and Immunity*: 69(10): 6558–6563.
86. Plotkin S. et al. Vaccine Fact Book. Pharma. Washington. 2013
87. Plotkin S., 2014. History of vaccination. Special feature: perspective.vol.111.
88. Plummer, E.M., Manchester, M., 2010. Viral nanoparticles and virus-like particles: platforms for contemporary vaccine design. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 3(2):174-96.
89. Pumpens P., Grens E. Artificial DNA: Methods and Applications. Artificial Genes for Chimeric Virus-Like Particles.1ªEdição.Boca Raton. 2002
90. Querido J.F., Echeverría M.G., Marti G.A., Costa R.M., Susevich M.L., Rabinovich J.E., Copa A., Montañó N.A., Garcia L., Cordova M., Torrico F., Sánchez-Eugenia R., Sánchez-Magraner L., Muñoz-Trabudua X., López-Marijuan I., Rozas-Dennis G.S., Diosque P., de Castro A.M., Robello C.,Rodríguez J.S., Altcheh J., Salazar-Schettino P.M., Bucio M.I., Espinoza B., Guérin D.M., Silva M.S., 2015. Seroprevalence of *Triatoma virus* (Dicistroviridae: Cripaviridae) antibodies in Chagas disease patients. *Parasites & Vectors*. 8:29
91. Querido, J. F. B., Agirre, J., Marti, G. A., Guérin, D. M. A., Silva, M. S., 2013. Molecular Techniques for Dicistrovirus Detection without RNA Extraction or Purification. *BioMed Research International*. 218593.
92. Quijano-Hernandez I., Dumonteil E., 2011. Advances and challenges towards a vaccine against Chagas disease. *Human Vaccines*. 7(11): 1184–1191.
93. Rodríguez-Morales, O., Monteón-Padilla, V., Carrillo-Sánchez, S. C., Rios-Castro, M., Martínez-Cruz, M., Carabarin-Lima, A., Arce-Fonseca, M., 2015. Experimental Vaccines against Chagas Disease: A Journey through History. *Journal of Immunology Research*. 489758.
94. Romano, P. S., Cueto, J. A., Casassa, A. F., Vanrell, M. C., Gottlieb, R. A., Colombo, M. I. 2012. Molecular and Cellular Mechanisms Involved in the *Trypanosoma cruzi*/Host Cell Interplay. *IUBMB Life*. 64(5): 387–396.
95. Rozendaal, J.A,1997. Vector control. Methods for use by individuals and communities.World Health Organization. 210-222.

96. Schijman, A.G., Bisio, M., Orellana, L., Sued, M., Duffy, T., et al., 2011 International Study to Evaluate PCR Methods for Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in Blood Samples from Chagas Disease Patients. PLoS Negl Trop Dis. 5(1): e931.
97. Shender, L. A., Lewis, M. D., Rejmanek, D., Mazet J. A. K., 2016. Molecular Diversity of *Trypanosoma cruzi* Detected in the Vector *Triatoma protracta* from California, USA. PLOS Neglected Tropical Diseases. 10(1): e0004291.
98. Silva, E.O.R., Wanderley D.M.V., Rodrigues V.L.C.C., 1998. *Triatoma infestans*: importância, controle e eliminação da espécie no Estado de São Paulo, Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. vol.31.
99. Snijder, J., Uetrecht, C., Rose, R.J., Sanchez-Eugenía, R., Marti, G.A., Agirre, J., Guérin, D.M.A., Wuite, G.J.L., Heck, A.J.R., Roos, W.H., 2013. Probing the biophysical interplay between a viral genome and its capsid. Nature chemistry. 5: 502-509.
100. Sosa-Estani S., Segura E. L., 2015. Integrated control of Chagas disease for its elimination as public health problem - A Review. Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz. 110(3): 289–298.
101. Sosa-Estani, S, Segura, E.L., Ruiz A.M., Velazquez, E., Porcel, B.M., Yampotis, C., 1998. Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas' disease. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 59:526-9.
102. Squires, G., Pous J., Agirre J., Rozas-Dennis, G.S., Costabel, M.D., Marti, G.A., Navaza, J., Bressanelli, S., Guérin, D.M., Rey F.A., 2013. Structure of the *Triatoma virus* capsid. Acta Crystallographica Section D. Structural Biology. 69:1026-37
103. Sánchez-Eugenía et al., 2015b: "Triatoma virus recombinant VP4 protein induces membrane permeability through dynamic pores". R. Sánchez-Eugenía, J. Goikolea, D. Gil-Cartón, L. Sánchez-Magraner, and D.M.A. Guérin. (2015b). J. Virol. 89(8):4645-4654.
104. Sánchez-Eugenía, R., Durana A., López-Marijuan, I., Marti, G. A., Guerin D. M., 2012. X-ray structure of *Triatoma virus* empty capsid: insights into the mechanism of uncoating and RNA release in dicistroviruses. Journal of General Virology.

105. Sánchez-Eugenia, R., Méndez, F., Querido, J.F., Silva, M.S., Guérin, D.M., Rodríguez, J.F., 2014. *Triatoma virus* structural polyprotein expression, processing and assembly into virus-like particles. *Journal of General Virology*. 96: 64–73.
106. Teixeira, A.R. L., Hecht M.M., Guimaro, M.C. , Sousa, A.O., Nitz N., 2011. Pathogenesis of Chagas' Disease: Parasite Persistence and Autoimmunity. *American Society for Microbiology*. Vol. 24. pp 592–630
107. Teixeira, D. E., Benchimol, M., Crepaldi, P. H., Souza, W., 2012. Interactive Multimedia to Teach the Life Cycle of *Trypanosoma cruzi*, the Causative Agent of Chagas Disease. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 6(8): e1749.
108. Tomasini, N., Diosque, P., 2015. Evolution of *Trypanosoma cruzi*: clarifying hybridisations, mitochondrial introgressions and phylogenetic relationships between major lineages. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*. 110(3): 403–413.
109. Tugyi, R., Uray, K., Iván, D., Fellingner, E., Perkins, A., Hudecz, F., 2004. Partial D-amino acid substitution: Improved enzymatic stability and preserved Ab recognition of a MUC2 epitope peptide. *Proceedings of National Academy of Sciences*. Vol.102: 2
110. Tyler, K.M., Engman, D.M., 2001.The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *International Journal for Parasitology*. 472-481
111. UNICEF. WHO. World Bank. State of the world's vaccines and immunization, 3rd ed. Geneva. 2009
112. Vargas-Parada, L., 2010. Kinetoplastids and Their Networks of Interlocked DNA. *Nature Education*. 3(9):63
113. Vicente, T., Roldão, A., Peixoto, C., Carrondo, M.J., Alves, P.M., 2011. Large-scale production and purification of VLP-based vaccines. *Journal of Invertebrate Pathology*. 107 Suppl: S42-8.
114. Vigilância em saúde: zoonoses. Ministério da Saúde. Brasília. 2009
115. WHO. Chagas disease: control and elimination. Report by the Secretariat. Sixty-third world health assembly. 2010
116. WHO. Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Third WHO report on neglected tropical diseases. Geneva. 2015
117. WHO. More on Control of Chagas Disease strategy. 2010

118. WHO. Report del grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas. 17–20 de abril de 2005, Actualizado en Julio de 2007, Buenos Aires, Argentina. 2005
119. WHO. Research Priorities for Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis. Technical Report of the TDR Disease Reference Group on Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis. Geneva. 2012
120. WHO. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Second WHO report on neglected tropical diseases. Geneva. 2013
121. Yan, D., Wei, Y.Q., Guo, H.C., Sun, S.Q., 2015. The application of virus-like particles as vaccines and biological vehicles. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(24):10415-32.
122. Zingales, B., Andrade, S.G., Briones, M.R.S., Campbell, D.A., Chiari, E., Fernandes, O., Guhl, F., Lages-Silva, E., Macedo, A.M., Machado, C.R., Miles, M.A., Romanha, A.J., Sturm, N.R., Tibayrenc, M., Schijman, A.G., 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Vol: 104, pp.1051-1054.
123. Zingales, B., Miles, M.A., Campbell, D.A., Tibayrenc, M., Macedo, A.M., Teixeira, M.M., Schijman, A.G., Llewellyn, M.S., Lages-Silva, E., Machado, C.R., Andrade S.G., Sturm N.R., 2012. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(2): 240-53.